



**Rol del AMPc en el dimorfismo del hongo C.
Albicans : Efecto del glucagon: Caracterización
de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc
y purificación de sus subunidades**

Zelada, Alicia M.

1997

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Rol del AMPc en el dimorfismo del hongo *C. albicans*
Efecto del glucagon
Caracterización de la quinasa de proteínas dependiente de
AMPc y purificación de sus subunidades

Autor:
Alicia M. Zelada

Directora:
Dra. María Leonor Cantore

Tesis presentada para optar al título de:
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Noviembre de 1997

Nº 29651

12

A mis padres
A Ceci

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Leonor Cantore por haberme guiado y apoyado a lo largo de este trabajo de tesis. Por ser un ejemplo de responsabilidad y honestidad. Por enseñarme a trabajar y a pensar con rigor científico, y fundamentalmente por su afecto y su paciencia inacabables.

A la Dra Susana Passeron por sus enseñanzas, su ejemplo de empuje y por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, Pedro Fernández Murray por su ayuda en el aprendizaje del abc del laboratorio, a Pato Pardo por su calidez y por sus apasionantes e instructivas discusiones científicas y no tanto, a Rocío Castilla y Kathy Walz por el tiempo y charlas compartidas, a Paula Alvarez porque aunque por poco tiempo fue un verdadero gusto trabajar con ella y a todos Pedro, Pato, Kathy, Rocío y Paula por aguantarme hasta ahora. A Noemí Arguello por su calidez y por cuidar de nosotros todos los días.

A las ex compañeras de Exactas, la Dra. Cristina Paveto, Teresa Alconada, Lilian Montero y Andrea Samela por su cariño, su buena onda y su alegría permanente que siempre se extrañan.

A la Dr. Silvia Moreno por ser mi consejera y fundamentalmente por ser una excelente docente y contagiarnos su pasión por la investigación. Y a las chicas de la PKA, Vanina, Silvia y Elba porque cada una a su manera siempre nos reciben de vuelta en "casa".

A los Dres Augusto García, Norma Pucheu, Norma Kerber y a todos los nuevos compañeros de Agronomía, por recibirnos, aceptarnos y por compartir los últimos años de esta tesis.

A Rocío Castilla por su apoyo invaluable en la realización del trabajo sobre el estudio del efecto del glucagon sobre la morfogénesis de *C. albicans*.

A la Dra Mirta Biscoglio por su asesoramiento en los experimentos de mapeo peptídico y a Laura Pirpignani por su buena disposición y ayuda en la realización de los mismos.

A mis amigos Gaby C., Gaby S. y Fernando que saben lo que es esto de ser biólogos, y a Fer R. y Noemí que tratan de entendernos, por su amistad y su apoyo en las buenas y en las malas.

Y por último a la parte más importante, mi familia, en especial a mamá y papá porque sin su aguante, apoyo y cariño no hubiese podido llegar hasta acá, a Ceci por soportar mis interminables charlas nocturnas sobre purificaciones, fosforilaciones y otras yerbas y por ser tan compañera. Y a todos, mamá, papá, Adri, Claudi, Ceci y la pila de sobrinos por ser una familia con todas las letras.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las becas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Facultad de Agronomía, lugares donde se realizó este trabajo.

RESUMEN

Se investigó el rol del AMPc en la morfogénesis de *Candida albicans*. El agregado exógeno del nucleótido o de agentes que elevan sus niveles intracelulares estimuló la germinación inducida por N-acetil-glucosamina; el glucagon mostró el mismo efecto estimulador, el cual fue bloqueado por su antagonista específico des His¹ [Glu⁹] glucagon amida, indicando una probable interacción de la hormona con un receptor de membrana similar receptor de glucagon. Por inmunofluorescencia indirecta se comprobó la unión de la hormona a la superficie celular de levaduras. Cuando se usó suero como inductor de la germinación el efecto estimulador del glucagon aumentó. Anticuerpos anti-glucagon bloquearon el efecto de la hormona. Estos resultados proveen evidencias para la participación del AMPc en el dimorfismo; sabiendo que el principal receptor de AMPc en células eucariotas es la subunidad reguladora (R) de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA), podemos esperar que esta enzima tenga un importante rol en la transición levadura-micelio. La PKA de *C. albicans* fue caracterizada y sus subunidades purificadas. Es una proteína tetramérica de 287 kDa compuesta por un dímero regulador (R) de 128 kDa y dos subunidades catalíticas de 78 kDa. La holoenzima exhibió una cooperatividad positiva en la activación por AMPc y se demostró la existencia de dos sitios de unión a AMPc en la subunidad R. La subunidad R fue fosforilada por la subunidad C a través de una reacción intramolecular, permitiendo clasificar a la PKA como de tipo II. La extrema sensibilidad de la subunidad C a la proteólisis impidió la purificación de la proteína nativa de alto peso molecular. Se caracterizó la fosforilación *in vitro* de R por CK2 y se investigó el efecto de dicha modificación sobre la funcionalidad de R. Se realizó el estudio de la fosforilación *in vivo* de la subunidad R.

Palabras clave: *Candida albicans*, AMPc, PKA, glucagon, dimorfismo.

INTRODUCCION

1. <u>Introducción a <i>C. albicans</i></u>	1
1.1. <u>Dimorfismo en <i>C. albicans</i></u>	4
1.2. <u>AMPc y dimorfismo en <i>C. albicans</i></u>	6
1.3. <u><i>C. albicans</i> y hormonas de mamíferos</u>	7
2. <u>Transducción de señales</u>	9
3. <u>Fosforilación de proteínas</u>	11
4. <u>Quinasa de proteínas dependiente de AMPc. Estructura, función y regulación</u>	12
4.1. <u>Características bioquímicas de la PKA</u>	14
4.1.1. Generalidades	14
4.1.2. La subunidad catalítica	15
4.1.2.1. Características generales	15
4.1.2.2. Isoenzimas de C	16
4.1.2.3. Modificaciones postranscripcionales de la subunidad C	17
4.1.3. Control de la actividad de PKA	18
4.1.3.1. AMPc	18
4.1.3.2. La subunidad regulatoria	19
4.1.3.3. Mecanismo de inhibición por R	20
4.1.3.4. El inhibidor específico de la PKA (PKI)	22
4.2. <u>Función y control de la PKA</u>	24
4.2.1. Control de la PKA <i>in vivo</i>	24
4.2.2. Localización subcelular de la PKA	26
4.2.2.1. Proteínas de anclaje	26
4.2.2.2. Translocación al núcleo	26
4.3. <u>Aspectos estructurales de la actividad de PKA</u>	28
4.3.1. Reconocimiento del sustrato	28
4.3.2. Estructura de la subunidad C	29
4.3.2.1. El dominio catalítico conservado	29
4.3.2.2. Estructura terciaria de C	30
4.3.2.3. Modificaciones postraduccionales	33
4.4. <u>PKA en eucariotas inferiores</u>	33
5. <u>Proteína quinasa CK2</u>	34
5.1. <u>Características bioquímicas</u>	34
5.2. <u>Rol fisiológico de la CK2</u>	36
OBJETIVOS	38
MATERIALES Y METODOS	
1. <u>Crecimiento, mantenimiento y morfogénesis de <i>C. albicans</i></u>	39
1.1. <u>Cultivo y mantenimiento de la cepa</u>	39

1.2. <u>Crecimiento levaduriforme de <i>C. albicans</i></u>	39
1.3. <u>Métodos para inducir la formación de tubos germinativos</u>	39
1.3.1. <u>Inducción de la germinación en medio de Soll y Bedell</u>	39
1.3.2. <u>Inducción de la germinación en medio MIG</u>	40
1.4. <u>Medios de cultivo</u>	41
1.4.1. <u>Medio descrito por Soll y Bedell</u>	41
1.4.2. <u>Medio inductor de la germinación (MIG)</u>	41
1.4.3. <u>Medio Sabouraud</u>	42
2. <u>Preparación de extractos de <i>C. albicans</i></u>	42
2.1. <u>Extractos solubles para purificación de las enzimas</u>	42
2.2. <u>Extractos solubles para técnicas inmunológicas</u>	42
2.3. <u>Inhibidores de proteasas</u>	43
2.4. <u>Inhibidores de fosfatasas</u>	43
3. <u>Cromatografía en Mono Q de extractos de <i>C. albicans</i></u>	43
4. <u>Purificación parcial de la PKA de <i>C. albicans</i></u>	44
5. <u>Purificación de la subunidad regulatoria</u>	45
6. <u>Purificación de la subunidad catalítica</u>	45
7. <u>Estimación de los parámetros estructurales e hidrodinámicos de la PKA y sus subunidades</u>	46
7.1. <u>Coefficientes de sedimentación. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa</u>	46
7.2. <u>Radio de Stokes. Tamiz molecular</u>	47
7.3. <u>Estimación del peso molecular de la PKA y sus subunidades</u>	48
7.4. <u>Cociente friccional</u>	48
8. <u>Medición de las actividades de la PKA</u>	48
8.1. <u>Medición de la actividad de PKA</u>	48
8.2. <u>Medición de capacidad ligante de AMPc</u>	49
8.3. <u>Ensayo de autofosforilación</u>	49
8.4. <u>Marcación por fotoafinidad de la subunidad regulatoria</u>	50
9. <u>Medición de actividad de CK2</u>	50
10. <u>Fosforilación de la subunidad R purificada</u>	50
10.1. <u>Fosforilación por la subunidad C de la PKA</u>	50
10.2. <u>Fosforilación por CK2</u>	51
11. <u>Fosforilación in vivo durante la morfogénesis</u>	51
12. <u>Determinación del aminoácido fosforilado</u>	52
13. <u>Mapeo peptídico</u>	53
13. 1. <u>Mapeo por proteólisis enzimática limitada</u>	53

13. 2. <u>Mapeo por proteólisis química</u>	53
14. <u>Técnicas inmunológicas</u>	53
14.1. Preparación de anticuerpos policlonales contra la R de <i>C. albicans</i>	53
14.2. Técnica de Western-blot	54
14.3. Inmunoprecipitación	55
14.4. Inmunofluorescencia	56
15. <u>Geles de poliacrilamida con SDS</u>	56
16. <u>Materiales</u>	57

RESULTADOS Y DISCUSION

1. <u>Efecto del glucagon y de los nucleótidos sobre la morfogénesis de <i>C. albicans</i></u>	58
1.1. <u>Inducción de la transición levadura-micelio en <i>C. albicans</i> por N-acetil-glucosamina (NAcGlc). Efecto estimulador del glucagon</u>	58
1.2. <u>Efecto del antagonista específico del glucagon sobre la actividad estimuladora del glucagon</u>	60
1.3. <u>Efecto de los nucleótidos sobre la germinación</u>	61
1.4. <u>Determinación a la formación del tubo germinativo por NAcGlc</u>	62
1.5. <u>Desarrollo de las hifas en presencia de glucagon y nucleótidos</u>	64
1.6. <u>Efecto del glucagon sobre la formación del tubo germinativo inducida por suero</u>	64
1.7. <u>Efecto del anticuerpo anti glucagon sobre la actividad estimuladora del glucagon</u>	67
1.8. <u>Detección por inmunofluorescencia de sitios de unión de glucagon a blastosporas de <i>C. albicans</i></u>	68
1.9. <u>Integración</u>	70
2. <u>Caracterización y purificación parcial de la PKA de <i>C. albicans</i></u>	72
2.1. <u>Purificación parcial de la holoenzima</u>	72
2.2. <u>Caracterización de la holoenzima</u>	73
2.2.1. <u>Cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la PKA y de sus subunidades</u>	73
2.2.1.1. <u>Determinación de los coeficientes de sedimentación</u>	73
2.2.1.2. <u>Determinación de los radios de Stokes</u>	74
2.2.1.3. <u>Determinación de la masa molecular</u>	74
2.2.1.4. <u>Determinación del cociente friccional</u>	76
2.2.2. <u>Cálculo de la Km para el képtido y el ATP</u>	77
2.2.3. <u>Especificidad de unión del AMPc a la holoenzima</u>	77
2.2.4. <u>Determinación de sitios de unión de AMPc a la subunidad R de la PKA</u>	77
2.2.4.1. <u>Activación por AMPc de la capacidad fosfotransferasa de la PKA</u>	79
2.2.4.2. <u>Asociación del AMPc a la PKA de <i>C. albicans</i></u>	80
2.2.4.3. <u>Cinética de disociación del AMPc[³H] unido a la holoenzima</u>	80

2.2.4.4. Efecto de los análogos de AMPc sobre la reacción de unión del AMPc[³ H] y su subsecuente disociación	81
2.3. <u>Efecto de policationes sobre la activación de la holoenzima</u>	83
2.4. Integración	88
3. <u>Caracterización y purificación de las subunidades de la PKA de <i>C. albicans</i></u>	90
3.1. <u>Cromatografía en Mono Q de extractos de células levaduriformes</u>	90
3.2. <u>Caracterización y purificación de la subunidad regulatoria</u>	92
3.2.1. Determinación de posibles isozimas de la subunidad R en levadura y micelio de <i>C. albicans</i>	92
3.2.2. Autofosforilación de la PKA de <i>C. albicans</i>	94
3.2.3. Purificación	96
3.2.4. Preparación y validación de anticuerpos específicos contra la subunidad R	99
3.3. <u>Purificación parcial y caracterización de la subunidad catalítica</u>	102
3.3.1. Purificación parcial	102
3.3.2. Reconstitución de la holoenzima de <i>C. albicans</i>	106
3.3.3. Detección de la subunidad C nativa en extractos crudos	107
3.3.4. Integración	109
4. <u>Estudio de la fosforilación de la subunidad R de <i>C. albicans</i></u>	111
4.1. <u>Fosforilación de la subunidad R por CK2 homóloga</u>	112
4.2. <u>Fosforilación de la holoenzima por CK2</u>	114
4.3. <u>Efecto de la fosforilación de CK2 sobre la actividad biológica de la subunidad R</u>	116
4.4. Estudio de la fosforilación <i>in vivo</i> de la subunidad R de <i>C. albicans</i>	118
4.4.1. <u>Determinación del aminoácido fosforilado <i>in vivo</i></u>	119
4.4.2. <u>Mapeo por clivaje químico de los sitios fosforilados <i>in vivo</i></u>	120
4.5. Integración	122
INTEGRACION GENERAL	125
PERSPECTIVAS	127
BIBLIOGRAFIA	128

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. Introducción a *Candida albicans*.

Candida albicans es un hongo patógeno-oportunista de mamíferos, causante de una de las micosis más comunes y con mayor incidencia mundial entre los seres humanos: *la candidiasis*.

C. albicans es un hongo diploide perteneciente al Orden-forma Criptococales, Subclase-forma Blastomycetidae, Clase-forma Deuteromycetes, Subdivisión Deuteromycotina. Es considerada una levadura imperfecta ya que no se le conoce ciclo sexual, se reproduce por gemación produciendo células esféricas llamadas *blastosporas*. En presencia de ciertas señales inductoras del medio ambiente puede producir formas filamentosas en las cuales las células permanecen unidas unas a otras luego de la división celular formando así largas cadenas. Estas formas filamentosas van desde el rango de *pseudohifas*, donde las células que forman los filamentos son elongadas pero aún elipsoides y presentan constricciones de la pared celular, hasta verdaderas hifas o *micelio*, donde las células de los filamentos son cilíndricas y se encuentran separadas entre si por septos perpendiculares (**figura I-1**).

La capacidad de *C. albicans* de adoptar estas diferentes morfologías podría contribuir a la colonización y diseminación dentro de los tejidos del huésped promoviendo la infección (Odss, 1988 y 1994).

Es un comensal habitual de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genital, y menos frecuentemente de la piel. Si bien la mayoría de los portadores no sufre ningún efecto nocivo como consecuencia de la colonización, una característica importante de la patogénesis de *C. albicans* es su capacidad de transformarse en infeccioso cuando disminuyen las defensas inmunológicas del huésped.

La enfermedad causada por este hongo puede presentarse con distintos grados de severidad, existiendo tres tipos básicos de infecciones: superficiales, localmente invasivas y sistémicas. Las infecciones superficiales son las más comunes, se producen en las mucosas de la cavidad oral y tracto respiratorio y en la piel. La candidiasis localmente

invasiva ocurre en pacientes inmunocomprometidos y se encuentra frecuentemente como ulceraciones del tracto intestinal, respiratorio o génito-urinario. La candidiasis sistémica es la variedad más severa e involucra la infección invasiva del parénquima de los órganos viscerales como el corazón, los riñones, el hígado, el bazo, los pulmones y el cerebro (Odds, 1979; Dei-Cas y Vernes, 1986).

La incidencia de la candidiasis sistémica ha aumentado en forma continua y alarmante en los últimos veinte años debido principalmente al aumento de las causas de depresión del sistema inmune como los tratamientos de quimioterapia, transplantes de órganos y especialmente al avance del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La candidiasis sistémica es la causante de aproximadamente la cuarta parte de las muertes de enfermos de SIDA, la misma cifra vale para los pacientes terminales de leucemia mientras que un tercio de los receptores de transplantes de médula ósea padecen la enfermedad.

Dado que el agente etiológico de esta micosis es ubicuo en el medio ambiente y forma parte de la flora microbiana normal, es casi imposible evitar la exposición a este organismo.

C. albicans es un microorganismo polimórfico, si bien las dos morfologías más frecuentemente encontradas son levadura y micelio. En la mayoría de las lesiones establecidas como candidiasis, el hongo produce ambas formas, de forma tal que la descripción cualitativa de la morfología de *C. albicans* en un tejido no prueba ni descarta la relación entre la forma y la patogenia (Odds, 1988). A pesar de que parecería ser que la forma miceliana está involucrada en los estadios tempranos de invasión, penetrando en los tejidos (Anderson y Odds, 1985), adhiriéndose al epitelio (Kimura y col., 1978), y evitando la fagocitosis (Smith, 1985), no existen evidencias concluyentes que muestren que la virulencia sea dependiente de una sola morfología.

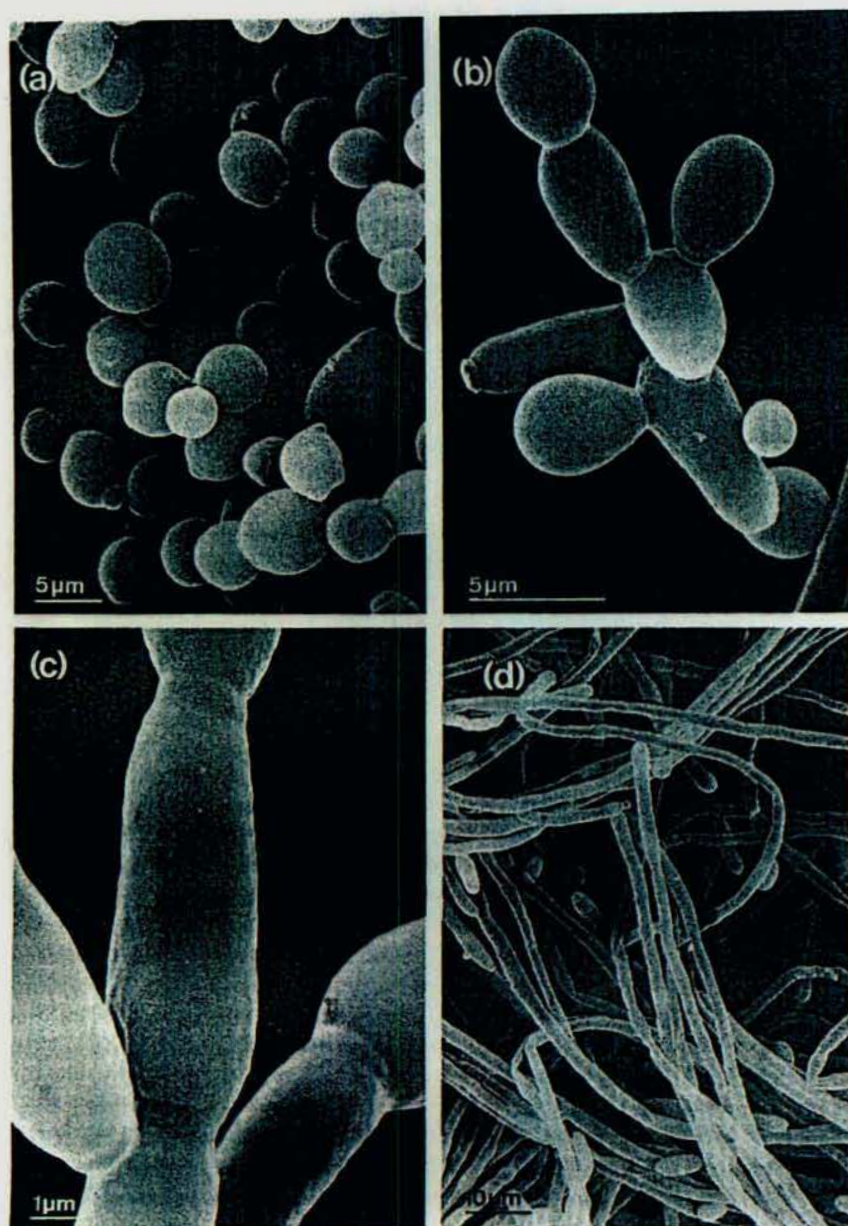


Figura I-1. Morfologías de *C. albicans*. (A) *Blastosporas*, células esféricas; (B) *Pseudohifas*, notar las constricciones de la pared celular mostrando claramente que estas células son cadenas de blastosporas y no verdaderas hifas; (C) en esta pseudohifa la célula está aún más alargada que en (B) y las constricciones de la pared son más pronunciadas; (D) *Micelio* o hifa verdadera, las constricciones de las células en los septos son mínimas o no se observan.

1.1. Dimorfismo en *C. albicans*.

El dimorfismo levadura-micelio exhibido por una gran variedad de especies fúngicas puede definirse como el proceso reversible por el cual el hábito levaduriforme se transforma, por alguna alteración en las condiciones ambientales o de cultivo, en un hábito miceliano por cambios que se producen a nivel celular (Stewart y Rogers, 1978). Este tipo de diferenciación no es un proceso esencial en el ciclo celular del organismo sino que constituye más bien una respuesta a un cambio en el hábitat en el cual se desarrolla.

Es de destacar que la mayoría de las especies fúngicas de importancia clínica son dimórficas, considerándose que la comprensión de este fenómeno es de suma importancia para el control de un grupo de micosis cada vez más relevantes, que afectan al hombre y a los animales. La dilucidación de los mecanismos que regulan la transición levadura-micelio podrían ayudar a comprender y controlar la enfermedad y obtener valiosa información acerca de la morfogénesis de hongos en general.

En este sentido *C. albicans* provee un modelo relativamente simple y fácil de manejar para el estudio de las bases moleculares de la morfogénesis y de la posible relación entre patogenicidad y morfología que, como ya se dijo, es aún motivo de debate.

La formación de micelio *in vitro* en *C. albicans*, está influenciada por la temperatura, la cantidad de inóculo, la composición del medio y la cepa (Van Rij, 1984). *In vitro* la transición levadura-micelio es inducida por incubación del cultivo a 37 °C en presencia de ciertos factores tales como L-aminoácidos (Land y col., 1976), N-acetil glucosamina (Simonetti y col., 1974) y suero. Una alta relación de CO₂: O₂, el pH neutro del medio y un medio pobre en nutrientes también estimulan el crecimiento hifal. (Evans y col., 1975; Pollak y Hashimoto, 1985). Las temperaturas bajas (20°C-25°C), el pH ácido (4 a 6) y los medios ricos promueven la formación de blastosporas (Gow, 1984; Odds, 1988).

Si bien se ha avanzado en cuanto al conocimiento de los factores ambientales que inducen la formación de micelio, las bases moleculares involucradas en el dimorfismo de

C. albicans aún no quedan claras, pero la tendencia de los hallazgos lleva a pensar que el factor determinante de los cambios morfológicos estaría relacionado con el ambiente a través de metabolitos que puedan actuar mediante procesos de señalización celular.

El avance en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos del metabolismo de *C. albicans* ha sido lento en relación a otras levaduras, por la dificultad que trae aparejada la diploidía y la falta de ciclo sexual, lo cual ha hecho dificultosa su manipulación genética, impidiendo la identificación de factores que contribuyen a la transición dimórfica y el aislamiento e identificación de mutaciones que afecten su patogenicidad.

Se han obtenido mutantes morfológicas y se han clonado diversos genes con el objetivo de hallar factores que estuviesen ligados a la morfogénesis y/o a su patogenicidad pero con resultados hasta ahora negativos (Shepherd y col., 1985; Kirsch y Whitney, 1991; Franklyn y Warmington, 1994; Gow y col., 1994).

Sin embargo recientemente se ha logrado un importante avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la morfogénesis de *C. albicans* utilizando un abordaje experimental alternativo, el cual se basa en la premisa que la transición de levadura a formas filamentosas es controlada por similares vías metabólicas en todos los hongos a pesar de responder a diferentes señales de inducción. Así se podrían identificar genes requeridos para la morfogénesis en sistemas genéticamente manipulables, clonarlos, disrumpir los genes homólogos de *Candida* y determinar si las mutantes de *Candida* son defectivas en la morfogénesis y/o en la patogénesis.

Este abordaje resultó factible a partir del descubrimiento del ciclo filamentoso en *Saccharomyces cerevisiae*, cuando Gimeno y col. (1992) demostraron que cepas diploides de *Saccharomyces* eran capaces de morfogenizar, pasando del crecimiento levaduriforme a la formación de pseudohifas en un medio sin nitrógeno.

Posteriormente se demostró que esta transición dependía de las proteínas Ste20p (factor de transcripción), Ste11, Ste7p y Ste12p, las cuales forman parte de la vía de las MAP quinasas¹ (MAPKs); las mutantes nulas de los genes que codifican para estas

¹ MAP quinasas, del inglés "mitogen activated proteins kinases"; quinasas de proteínas activadas por mitógenos.

proteínas son defectivas tanto para el 'mating' como para el crecimiento filamentoso (Liu y col., 1993; Mosch y col., 1996).

El rol de los genes de las MAPK en la morfogénesis de *Candida* fue estudiado utilizando la información de *Saccharomyces* como guía. Los genes homólogos de STE20, STE7 y STE12 en *Candida* (CPH1, HST7 y CST20 respectivamente) fueron clonados y usados para construir mutantes nulas en *Candida*. Las cepas homocigotas para las mutaciones en dichos genes fueron parcialmente defectivas para el desarrollo hifal en medio sólido (Liu y col., 1994; Kohler y Fink, 1996; Leberer y col., 1996). Sin embargo estas mutantes de la vía de las MAPK fueron capaces de filamentosar en medio líquido y en respuesta al suero.

Los resultados de estos trabajos son de suma importancia ya que prueban que en el proceso de diferenciación está involucrada una vía de transducción de señales que determina la activación de un factor de transcripción y por otro lado sugiere la existencia de más de una vía que lleva a la inducción del crecimiento hifal ya que la delección de estos genes sólo afecta la morfogénesis en medio sólido.

De estos estudios podemos concluir que la morfogénesis en *C. albicans* es un proceso complejo, desencadenado por diferentes inductores los cuales muy probablemente utilizan diferentes vías metabólicas para desencadenar la transición dimórfica. El conocimiento de todos los genes involucrados en estas múltiples vías podría llevar a descubrir importantes blancos terapéuticos.

1.2. AMPc y dimorfismo en *C. albicans*.

El posible rol del AMPc en el desarrollo y la morfogénesis de los hongos ha sido intensamente estudiado. Existen numerosas evidencias de la intervención del AMPc en la diferenciación de distintos hongos (Medoff y col., 1981; Orlowski, 1991; Gold y col., 1994).

En el caso de *C. albicans* Niimi y col., (1980) y Chattaway y col., (1981) han informado que la formación de tubos germinativos en esta especie está acompañada por un aumento de la concentración de AMPc intracelular. Más exactamente, Chattaway y

col., informaron que este aumento ocurría dentro de la hora de germinación y dependía de la temperatura de incubación a 37 °C. También observaron que el agregado exógeno de teofilina (inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc) aumentaba la germinación de las blastosporas con un simultáneo aumento del AMPc intracelular. Por su parte Niimi y col. lograron inducir la germinación a temperaturas no permisivas por el agregado exógeno de dbAMPc en presencia de ciertos inductores.

Más recientemente Sabie y Gadd (1992) encontraron que el agregado de AMPc y nucleótidos aumentaba la formación de tubos germinativos en medio líquido definido a 25 °C, utilizando como inóculo levaduras en fase logarítmica.

Otros autores estudiaron la relación entre el AMPc y la morfogénesis en *C. albicans* pero contrariamente a lo hallado por Niimi y col. no encontraron que el dbAMPc ni la teofilina agregados a los medios inductores de germinación tuviesen ningún efecto sobre la morfogénesis.

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron una caída de los niveles de AMPc en un estadio temprano de la morfogénesis y un aumento gradual de los niveles del nucleótido a lo largo del proceso de formación del micelio (Egidy y col., 1990). Se observó un efecto inhibitorio del AMPc, del dbAMPc y de la teofilina sobre la germinación (Egidy y col., 1989; Paveto y col., 1990). La contradicción entre estos resultados y los de otros autores nos llevó a reinvestigar la influencia de los niveles de AMPc en la emisión del tubo germinativo. Los resultados de esta investigación forman parte de esta tesis doctoral.

1.3. *C. albicans* y hormonas de mamíferos.

Es sabido que los cambios ambientales afectan profundamente la transición dimórfica de *C. albicans* y se han descripto varios inhibidores y estimuladores (Odds, 1988). Ya hemos dicho que uno de los principales factores que predisponen a la infección por *C. albicans* es el estado inmunológico del huésped; otro factor que se ha visto relacionado con la predisposición a sufrir candidiasis es el estado hormonal del huésped.

Se ha observado, por ejemplo, que el embarazo o el uso de anticonceptivos orales que contienen estrógenos predisponen a las mujeres a la candidiasis vaginal (Odds, 1979). Por otro lado la diabetes mellitus y otro tipos de desórdenes endócrinos suelen estar asociados con infecciones por *C. albicans*.

Por lo expuesto anteriormente resultó de interés para diferentes laboratorios investigar la existencia de una posible relación entre las hormonas de mamíferos y la transición dimórfica en *C. albicans*.

Se han identificado en *C. albicans* proteínas de unión a corticosterona (CBP) (Loose y col., 1981), a progesterona (Loose y col., 1981; Powell y Drutz, 1983) y a estrógenos (EBP) (Skowronski y Feldman, 1989). Loose y col., (1981) informaron que las CBP de *C. albicans* eran capaces de unir tanto corticosterona como progesterona con similar afinidad. Existen escasas evidencias de la relación entre enfermedades asociadas a altos niveles de corticosterona y la infección por *C. albicans*. Sin embargo hay una fuerte asociación entre el embarazo y la candidiasis vaginal; los altos niveles de progesterona en el embarazo parecerían correlacionarse con la presencia de CBP en el citosol de *C. albicans*; asimismo las infecciones con *Candida tropicalis* y *Candida pseudotropicalis* no aumentan durante el embarazo y no se detectó CBP en el citosol de estos parásitos. Mas aún, Loose y col., (1981) informaron la presencia de una sustancia presente en el extracto etanólico de *C. albicans*, capaz de competir reversiblemente por las CBP citosólicas del hongo así como por los receptores clásicos de corticosterona de mamífero, sugiriendo que esta sustancia representa el ligando endógeno de la proteína de unión.

Más recientemente, Brambley y col., (1990) describieron la existencia de sitios de unión específicos y de alta afinidad para la hormona luteinizante (hLH) y para la gonadotrofina coriónica humana (hCG).

Se ha reportado el efecto estimulatorio de hormonas humanas como la hLH (Kinsman y col., 1988), la hCG (Caticha y col., 1992), prostaglandina E2 y el neurotransmisor β -endorfina (Kalo y Klein y Witkin, 1990) sobre la transición dimórfica del hongo.

Es de particular importancia el hallazgo de una proteína de *C. albicans* que posee reacción inmunológica cruzada con la hCG y es 100 veces más potente que la hormona en estimular la transición dimórfica (Caticha y col., 1993). Se postula que dicha proteína tendría un efecto autócrino-parácrino sobre *C. albicans* controlando su patogenicidad.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que *C. albicans* posee una adenilil ciclasa dependiente de Mg^{+2} y activable por nucleótidos de guanina (Paveto y col., 1990). También se ha demostrado que las hormonas del huésped como glucagon, hLH y hCG son capaces de estimular la actividad de la adenilil ciclasa y de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) de *C. albicans* en células permeadas (Paveto y col., 1991). Más recientemente, utilizando anticuerpos específicos y precursores radioactivos, se demostró la existencia de proteínas G triméricas (Gs estimuladora y Gi inhibitoria) en membranas del hongo (Paveto y col., 1992).

Todos estos resultados tomados en conjunto sugieren que *C. albicans* estaría en condiciones de utilizar una vía de transducción de señales mediada por AMPc similar a la descrita en eucariotas superiores, capaz de permitirle sensor el estado hormonal del huésped desencadenando en ciertas circunstancias la transición dimórfica.

2. Transducción de señales.

La célula eucariota es una entidad altamente regulada capaz de responder tanto a los cambios que se producen en el medio intracelular como a los estímulos externos.

Estos procesos de estímulo-respuesta se llevan a cabo a través de una cascada de reacciones que involucran enzimas específicas, proteínas regulatorias y otros factores. El estímulo externo es primero transformado en una señal intracelular a nivel de la membrana plasmática por interacción directa del estímulo con receptores específicos situados en la membrana. Luego el mensaje intracelular es traducido en actividades regulatorias las cuales finalmente modifican y regulan las proteínas involucradas en la respuesta biológica.

Los sistemas biológicos de respuesta a estímulos externos operan a través de moléculas conocidas como segundos mensajeros entre los cuales encontramos los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc; calcio; diacilglicerol; fosfoinosítidos y metabolitos del ácido araquidónico.

En los procesos biológicos cuya respuesta es mediada por AMPc, la interacción estímulo-receptor produce la activación de la adenilil ciclasa. Esta enzima, responsable de la síntesis de AMPc, es activada por proteínas transductoras que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) y que se encuentran acopladas al receptor funcionando como intermediarias en el camino de señalización a través de la membrana.

Como consecuencia de la activación de la adenilil ciclasa se produce un aumento de los niveles de AMPc intracelulares, que actuando como segundo mensajero, transmite la información a la maquinaria celular.

El aumento de los niveles intracelulares de AMPc conduce principalmente a la activación de la PKA y en consecuencia a la fosforilación de numerosas proteínas tanto estructurales como regulatorias que participan en puntos claves de los diferentes caminos metabólicos.

Para terminar este proceso de transducción de señales existen al menos dos mecanismos conocidos, uno es la hidrólisis del segundo mensajero la cual es llevada a cabo por las fosfodiesterasas de AMPc y el otro consiste en regular la señal a nivel del receptor ya sea por fosforilación que lo insensibilice a una estimulación posterior, o por internalización del mismo. A su vez las fosfatasas de proteínas, son las encargadas de remover el fosfato a las proteínas fosforiladas por las quinasas volviendo el sistema al estado original.

Tanto las fosfodiesterasas como las fosfatasas están altamente reguladas. las fosfodiesterasas son moduladas por fosforilación, por Ca^{+2} -calmodulina y GMPc. Las fosfatasas son reguladas por la combinación de unidades regulatorias e inhibidores específicos.

Este sistema de regulación en cascada provee a la célula de un mecanismo de control eficiente, flexible y sensible dándole la posibilidad de responder ante señales del medio a través de la modificación de sus funciones metabólicas.

3. Fosforilación de proteínas.

En la década del 50, a partir del descubrimiento de la fosforilasa quinasa por el grupo de Fisher y Krebs (1955), la fosforilación de proteínas se reveló como un sensible mecanismo regulatorio de la actividad enzimática, debido a sus características de modificación covalente y reversible.

El descubrimiento en 1978 de que la proteína transformante del virus del sarcoma de Rous (pp60^{vsrc}) tenía actividad de quinasa (Collet y Erickson, 1978) y que transfería fosfato a tirosina abrió una nueva dimensión en el campo de la fosforilación de proteínas.

A fines de la década del 70 tan sólo unas pocas quinasas de proteínas habían sido caracterizadas, sin embargo a partir de la década del 80 el número de miembros de la familia de las proteínas quinasas ha ido aumentando en forma exponencial y actualmente se han identificado, sólo en mamíferos, más de cien quinasas de proteínas diferentes. Este crecimiento acelerado en el descubrimiento de nuevas quinasas se ha dado fundamentalmente a partir de la utilización del clonado molecular y de las técnicas de secuenciación.

Las quinasas de proteínas conforman una familia diversa que comprende desde receptores de factores de crecimiento que atraviesan la membrana hasta proteínas quinasas que controlan el ciclo celular.

Las quinasas pueden ser clasificadas según el tipo de aminoácido que fosforilan en dos grupos generales: aquellas que transfieren un grupo fosfato a los aminoácidos serina o treonina (Ser/Thr quinasas) y aquellas que los transfieren al aminoácido tirosina (Tyr quinasas).

Dentro del primer grupo se incluyen a la PKA, PKG (quinasa dependiente de GMPc); PKC, CaMK (quinasa dependiente de Ca⁺²-calmodulina), CK1 (quinasa de proteínas CK1) y CK2 (quinasa de proteínas CK2), CDK (quinasa dependientes de ciclinas), Raf quinasa, MAPK, DNA.PK (quinasa dependiente de DNA).

Entre las quinasas que fosforilan en tirosina está la subfamilia de tirosinas quinasas Src que en su mayoría se encuentran asociadas a la membrana intracelular, los

receptores tirosina quinasa como el receptor de insulina, los receptores de factores de crecimientos como EGF y PDGF y las tirosinas quinasas citoplasmáticas como la quinasa Abl Tipo I.

La MAPKK sería una quinasa perteneciente a ambos grupos ya que fosforila en treonina y tirosina.

Existe un tercer grupo de quinasas las histidina/aspártico quinasas que son proteína quinasas descubiertas en bacterias las cuales se autofosforilan en histidina y transfieren este fosfato a un residuo aspártico. En eucariotas superiores se han encontrado secuencias homólogas a éstas pero sólo se ha detectado actividad de quinasa en *Saccharomyces* (Swanson y col., 1994).

Otra factor de diversidad importante es el mecanismo de activación. Con la excepción de las enzimas oncogénicas, todas las proteínas quinasas son enzimas fuertemente reguladas y son activadas o desactivadas en respuesta a señales específicas tan diversas como los nucleótidos AMPc, GMPc y AMP (PKA, PKG y quinasa dependiente de AMP respectivamente), Ca^{+2} (CaMK), diacilglicerol (PKC), RNA doble cadena y hemina (IF-2 quinasas), ciclinas (CDKs) y fosforilación (MAPK, MAPKK; Raf).

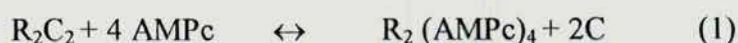
Los estudios comparativos de las secuencias de los miembros de la familia de las quinasas han demostrado que estas enzimas, a pesar de su considerable diversidad, han evolucionado al menos en parte a partir de un ancestro común. Las regiones de estas proteínas que no están involucradas en la función catalítica y que no guardan entre si relaciones evolutivas evidentes, son las responsables de la localización subcelular así como de la regulación y activación de cada una de las quinasas de proteínas que integran este variado grupo de macromoléculas regulatorias.

4. Quinasa de proteínas dependiente de AMPc. Estructura, función y regulación.

Uno de los sistemas de transducción de señales mejor caracterizado en células eucariotas es el que involucra al AMPc como segundo mensajero. Como ya se ha dicho

un aumento de la concentración intracelular de AMPc producida por activación de la adenilil ciclasa provoca la activación de una enzima clave, la PKA.

La PKA de prácticamente todos los sistemas estudiados existe en la célula en la forma de una holoenzima tetramérica inactiva formada por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C); al aumentar los niveles intracelulares de AMPc la subunidad R une AMPc y la holoenzima se disocia liberando la subunidad C de acuerdo a la ecuación general (1), mientras la subunidad R permanece como dímero unido al AMPc.



Los estudios dirigidos a la comprensión del metabolismo del glucógeno llevaron al descubrimiento de la PKA como el nexo, hasta ese momento desconocido, entre la activación de la fosforilasa quinasa y la actividad biológica del AMPc en la glucogenolisis. De esta manera, la glucogenolisis mediada por AMPc que se basa en la activación seriada de quinasas de proteína (una cascada de quinasas), resultó el primer ejemplo de la tremenda importancia de la fosforilación proteica como modulador de la actividad de las proteínas y del rol crucial de las quinasas de proteínas como mediadoras de la transducción de señales externas hacia el interior de la célula; asimismo demostró que las mismas quinasas de proteína pueden estar sujetas a regulación por fosforilación.

Rápidamente se vio que aquella 'fosforilasa quinasa quinasa' regulada por AMPc de la glucogenolisis era una enzima multifuncional capaz de fosforilar un gran número de sustratos diferentes, mediando una multitud de respuestas gatilladas por el aumento del nivel de AMPc en la célula. La PKA surgió así como el principal sensor de AMPc en la célula eucariota siendo su subunidad R el receptor primordial del nucleótido cíclico.

Una serie de características han hecho de la PKA el prototipo de quinasa de proteínas y se la ha tomado como modelo para el estudio de los mecanismos de acción de toda una familia de enzimas. El hecho, único entre las quinasas de proteínas, de que el dominio regulatorio esté en una subunidad separada del dominio catalítico ha facilitado algunos aspectos del estudio de la subunidad catalítica; la subunidad C de la PKA fue la

primera quinasa de proteínas secuenciada (Shoji y col.,1981) y ha sido tomada como modelo para definir dominios y subdominios esenciales para la función de quinasa de proteínas y para determinar el grado de homología del dominio catalítico con el de otras quinasas de proteínas (S. K. Hanks y col.,1988). La subunidad C es la primera quinasa de proteínas para la cual se ha determinado su estructura cristalina en presencia (Knighton y col.,1991) y en ausencia de co-sustratos (Bossemeyer y col.,1993; Zheng y col.,1993).

4.1. Características bioquímicas de la PKA.

4.1.1. Generalidades.

La PKA ha sido purificada a homogeneidad a partir, fundamentalmente, de músculo esquelético y cardíaco que constituyen una fuente accesible y relativamente rica en la enzima (Beavo y col., 1974; Rubin y col., 1974). A través de cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa) utilizando elución con gradiente salino a pH 6,5 la PKA de gran cantidad de tejidos se obtiene parcialmente purificada en dos picos mayoritarios: uno de ellos que eluye a alrededor de 150 mM ClNa, contiene la llamada holoenzima tipo I y el otro que eluye a 200-250 mM contiene la holoenzima tipo II. Las PKAs tipo I y II difieren en sus subunidades regulatorias mientras sus subunidades catalíticas pueden ser de cualquiera de las isoformas de C (ver más adelante); las subunidades R fueron, en consecuencia llamadas RI y RII. Por análisis de la holoenzima en SDS-PAGE se observa que la migración de las subunidades C corresponde a proteínas de alrededor de 40 kDa mientras que la migración de RI y RII corresponde a proteínas de 49 y 55 kDa respectivamente; la masa molecular calculada para las holoenzimas I y II es de aproximadamente 150 kDa que corresponde a los respectivos tetrameros RI_2C_2 y RII_2C_2 .

4.1.2. La subunidad catalítica.

4.1.2.1. Características generales.

Las propiedades catalíticas de la PKA se derivan de las de su subunidad C; la mayoría de los estudios que han llevado a caracterizar enzimáticamente a C se han realizado con las enzimas purificadas de músculo cardíaco (porcino o bovino), de músculo esquelético y más recientemente utilizando enzimas recombinantes.

La PKA transfiere el grupo fosfato y del ATP a residuos serina o treonina de diferentes sustratos proteicos; la secuenciación de los sitios de fosforilación de una gran cantidad de sustratos ha permitido establecer la existencia de una secuencia consenso de reconocimiento de la PKA caracterizada por la presencia de residuos básicos (usualmente dos) y, hacia el extremo C-terminal, el grupo aceptor (serina o treonina) separado por uno o dos residuos de cualquier clase (x); suele encontrarse un residuo hidrofóbico hacia la posición C-terminal del grupo aceptor. Las secuencias consenso de la PKA se pueden entonces representar: R-R-x-S/T y R-x-S/T. Como se verá más adelante, las características estructurales de los sustratos y los residuos que resulten cercanos en el espacio contribuyen al reconocimiento de la enzima.

Originalmente se utilizaron mezclas de histonas como sustratos para la medición de la actividad de la PKA y más recientemente se comenzó a utilizar oligopéptidos; el heptapéptido (kémpido), que contiene el sitio de fosforilación de la piruvato quinasa de hígado porcino, resultó ser un excelente sustrato de la PKA con una K_m de 16 μM y una V_{max} de 20 $\mu moles/min/mg$ (Kemp y col., 1977). Si la serina fosforilable se reemplaza por ejemplo por alanina, se derivan pseudosustratos que se unen a la enzima pero que no pueden ser fosforilados; estos pseudosustratos son inhibidores de la actividad enzimática con K_i s en el rango submilimolar. Proteínas que contengan estas secuencias 'pseudosustrato' podrían contribuir a la regulación de la enzima *in vivo* como es el caso de la propia subunidad regulatoria de la PKA (RI), o del inhibidor termoestable específico (PKI) que poseen una capacidad inhibitoria de la enzima en el rango nanomolar (ver tabla I-1.).

El ATP debe estar complejoado con cationes divalentes para que su fosfato γ sea transferido a proteínas; Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} pueden actuar como cofactores. En presencia de Mg^{2+} la K_m para el ATP es usualmente alrededor de 10 μM .

El mecanismo de transferencia del fosfato a la proteína sustrato se discutirá con más detalle al hablar de la estructura cristalina de C.

Tabla I-1. Secuencia consenso de sustratos de la PKA.

Kémtido	K_m 16 μM	LRRASLG
Ala kémtido	K_i 200 μM	LRRAALG
Asn Ala kémtido	K_i 20 μM	LRRNALG
PKI (5-24) ^a	K_i 2nM	⁵ TTYADFIASGRTGRRNAIHD
Subunidad RI	K_i 0,2-0,3 nM	⁹² RRRRGAISA
Subunidad RII	K_i 0,2-0,3 nM	⁹⁰ FDRRVSVCA
Secuencia consenso		RRxSy ^b

^a Derivado que contiene los residuos 5 a 24 del inhibidor nativo.

^b x en la secuencia consenso puede ser cualquier aminoácido; y es usualmente hidrofóbico.

La numeración de los aminoácidos corresponde a la secuencia de las subunidades R bovinas.

4.1.2.2. Isoenzimas de C.

Durante varios años se aceptó que las diferentes preparaciones purificadas de subunidad C obtenida de diferentes tejidos de mamífero constituían preparaciones homogéneas pese a que se habían descripto variantes isoeléctricas de las mismas; las técnicas de clonado revelaron algo más tarde la existencia de isoformas de la subunidad C. En vista de la multitud de efectos biológicos mediados por el AMPc, la idea de diferentes formas de C destinadas a mediar distintas funciones celulares parece apropiada para explicar su rol en el metabolismo celular. Sin embargo hasta el momento no ha sido

posible asignar una isoforma particular de C a una función específica ni a un tipo particular de R.

Las isoformas denominadas α y β han sido clonadas de tejidos bovino, porcino, murino y humano. C β presenta más del 90% de identidad con C α a nivel aminoacídico (Uhler, y col., 1986 (a); Uhler y col., 1986(b); Shower y Maurer 1986). Una tercera forma, C γ , ha sido clonada a partir de testículo, y diverge de las C α y C β humanas en un 17% y 21 % respectivamente a nivel de su putativa secuencia aminoacídica (Beebe y col., 1990). Han sido aisladas otras dos formas de C relacionadas con C β bovina, y C α humana, denominadas C β 2 y C α 2, que probablemente provengan de splicing alternativo de las subunidades C β y C α y cuya relevancia fisiológica se desconoce hasta el momento (Wiemann y col., 1991; Thomis y col., 1992). Se han caracterizado las subunidades C en otras especies de eucariotas superiores tales como *Aplysia californica*, *Caenorhabditis elegans* (Beushausen y col., 1992; Gross y col., 1990).

Alrededor de 250 residuos aminoacídicos de la secuencia primaria de C (corresponde a aproximadamente 70% de la forma bovina de 40 kDa) representan lo que se denomina 'core' o dominio catalítico de la subunidad y contiene los subdominios necesarios para cumplir la función de transferir el grupo fosfato del ATP a la proteína sustrato (se tratará en detalle más adelante); el rol fisiológico de las otras zonas de la proteína no se conoce aún.

4.1.2.3. Modificaciones postranscripcionales de la subunidad C.

La subunidad C se encuentra miristoilada en su dominio amino terminal vía una unión amida a glicina (Carr y col., 1982); la función biológica de la miristoilación de C no se conoce. Las mutaciones de C que impiden su miristoilación no afectan la formación de la holoenzima, la activación por AMPc, ni la actividad de la enzima en eventos citosólicos o nucleares mediados por AMPc (Clegg y col., 1989); existen resultados que parecerían indicar que la miristoilación podría estar relacionada con una mayor estabilidad térmica de la proteína (Yonemoto y col., 1993).

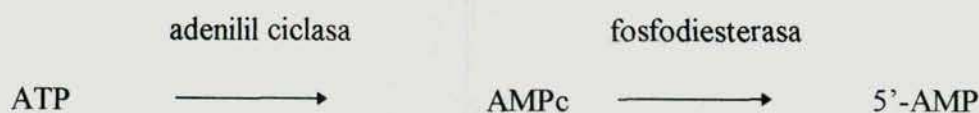
Como gran cantidad de proteínas, la misma subunidad C está sujeta a fosforilación; en condiciones nativas los residuos que se encuentran fosforilados son Thr¹⁹⁷ y Ser³³⁸ en la C α bovina (Shoji y col.,1981). La fosforilación en Thr¹⁹⁷ es estable y se cree que es parte necesaria en la maduración de la enzima que le permite adoptar correctamente su estructura secundaria activa; el fosfato en esta posición es resistente al tratamiento con fosfatasas y es posiblemente el resultado de una reacción autocatalítica aunque no necesariamente intramolecular (Shoji y col.,1979; Yonemoto y col.,1993). El fosfato en Ser³³⁸ no parece tener significación en la actividad catalítica de la enzima.

4.1.3. Control de la actividad de PKA

La actividad enzimática de la subunidad C de la PKA está fundamentalmente controlada por tres factores: a) por el AMPc, b) por la subunidad regulatoria R y c) por el inhibidor termoestable específico de la PKA. Los dos primeros en realidad operan juntos, ya que la unión del nucleótido cíclico a R neutraliza la actividad inhibitoria/regulatoria de R permitiendo la disociación de la holoenzima y la liberación de la subunidad C.

4.1.3.1. AMPc.

La molécula de AMPc se forma a partir del ATP por acción de la adenilil ciclasa celular en respuesta a una serie de estímulos; la degradación del AMPc es catalizada por la fosfodiesterasa:



La actividad relativa de las dos enzimas determina el nivel intracelular del nucleótido que a su vez es responsable del estado de activación de las holoenzimas I y II de la PKA. Dependiendo del tipo celular, del tejido y de una serie de parámetros los

niveles basales intracelulares de AMPc pueden variar considerablemente; se puede considerar una concentración promedio de 10^{-7} M la que, dependiendo del grado y tipo de estimulación puede aumentar en un orden de magnitud

4.1.3.2. La subunidad regulatoria.

Dada la enorme importancia regulatoria que posee la fosforilación de proteínas es crucial para la célula poseer mecanismos de control eficientes y rápidos que permitan disponer de quinasas de proteínas activas solo en el momento en que su actividad es requerida. En el caso de la PKA su subunidad regulatoria, blanco del AMPc, provee ese nivel de control al unirse reversiblemente a C e inhibirla en función del nivel intracelular del nucleótido, cuanto mayor sea la concentración intracelular de AMPc mayor será la concentración de C libre es decir, más favorecido estará el estado activado de la enzima.

Si bien existe cierta heterogeneidad entre las distintas subunidades R, todas comparten algunas características estructurales. En la **figura I-2** se muestra un esquema general en el que se detallan los dominios de R.

El sitio de dimerización (aproximadamente 40-50 residuos), situado en el extremo amino terminal, está seguido por el dominio que contiene la región 'bisagra' y que interactúa con el sitio catalítico de la subunidad C. El resto de la molécula está formada por dos regiones conservadas, repetidas en tandem cada una de las cuales contiene una secuencia de alrededor de 15 residuos esenciales para la interacción con el AMPc (Taylor y col, 1988).

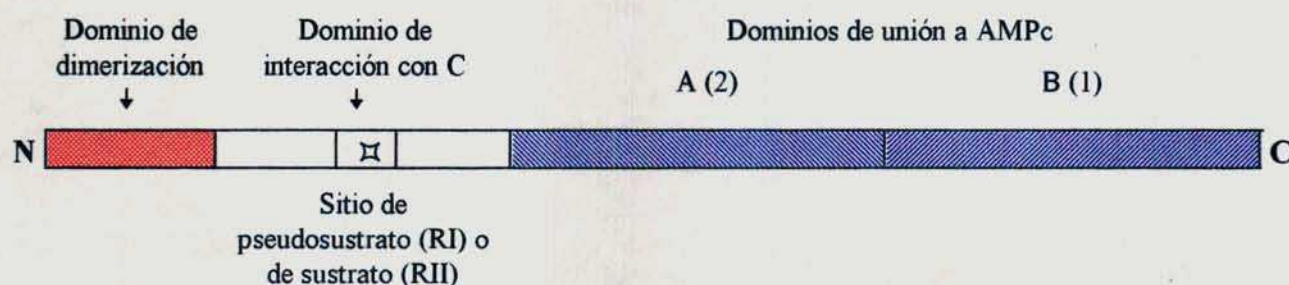


Figura I-2. Dominios funcionales de la subunidad regulatoria.

Las subunidades RI y RII de origen bovino han sido quizá las más estudiadas; están compuestas por 379 y 400 residuos (Titani y col., 1984; Takio y col., 1984) y para ambas se han encontrado dos subtipos, RI α , RI β y RII α , RII β todas codificadas por distintos genes; las formas β usualmente están expresadas en forma tejido específico mientras las formas α se expresan constitutivamente (McKnight y col., 1988). Entre las formas α y β existe una homología de 70-80%.

La diferencia más importante entre las subunidades tipo RI y RII reside en la porción amino terminal de las proteínas. Las subunidades RI contienen un sitio de pseudosustrato en la región bisagra; RII contiene un sitio de verdadero sustrato que resulta fosforilado en una reacción intramolecular (ver tabla I-1). Otra diferencia importante reside en el sitio de dimerización en el cual RI tiene dos residuos cisteína fundamentales para la dimerización (Bubis y col., 1987). La estructura dimérica, que no es esencial para la interacción con C, probablemente resulta de una interacción de alta afinidad entre los primeros 45 aminoácidos en la zona amino terminal, que en el caso de RI probablemente esté aumentada por las uniones disulfuro establecidas entre las cisteínas antes mencionadas (Cis¹⁶ y Cis³⁷ en la subunidad R bovina). La existencia de uniones disulfuro entre proteínas intracelulares es una excepción debido a las condiciones reductoras dentro de la célula; la facilidad de la formación del dímero aún *in vitro* indica que muy probablemente hay parámetros adicionales responsables de su formación.

4.1.3.3. Mecanismo de inhibición por R.

Los segmentos peptídicos de las subunidades R localizados en la región bisagra, se unen a C en el sitio de reconocimiento del sustrato impidiendo la unión de los verdaderos sustratos proteicos (Taylor y col., 1992) ejerciendo de esta manera su acción inhibitoria sobre la actividad fosfotransferasa de C. El dominio inhibitorio en las dos Rs contiene las dos argininas fundamentales para el reconocimiento de la PKA; como se detalla en la **tabla I-1.**, en el caso de RI el sitio del pseudosustrato es Arg⁹⁴-Arg-X-Ala y

en el caso de RII el sitio de verdadero sustrato es Arg⁹²-Arg-X-Ser y resulta fosforilado en la holoenzima tipo II. El hecho de que oligopéptidos que contienen la secuencia de pseudosustrato sean débiles inhibidores de C hace pensar que otros elementos estructurales de RI deben tener un papel relevante en su interacción con C; esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de ser necesaria la presencia de ATP-Mg para lograr una efectiva inhibición de C por RI.

En el caso de RII también es necesario postular la existencia de sitios de alta afinidad por C ya que aquella inhibe a la subunidad C muy eficientemente aún en la forma fosforilada, es decir su fosforilación no produce disociación de la holoenzima como podía esperarse para un verdadero producto.

Los parámetros que gobiernan la interacción del AMPc con la holoenzima y de las subunidades entre sí están sujetas a una serie de variables que hacen que la situación de la enzima estudiada *in vitro* refleje solo hasta cierto punto la real situación *in vivo*; mas aún, la ecuación de disociación planteada en la Introducción, representa el punto final de una reacción con varias etapas intermedias entre las se encuentran la autofosforilación de las subunidades, la influencia de la unión de ATP-Mg y la presencia de diferentes isoformas de las subunidades (Døskeland y col., 1993). La afinidad de los dos tipos de subunidades R por las subunidades C está en el orden de 10^{-10} M en ausencia y alrededor de 10^{-6} M en presencia de cantidades saturantes de AMPc, es decir que la unión de AMPc disminuye en 10^4 veces la afinidad de R por C; a concentraciones fisiológicas de enzima ($2-7 \times 10^{-7}$ M) es de esperar que la misma esté completamente disociada. Por otra parte, en el caso de RII la autofosforilación disminuye la afinidad de R por C en aproximadamente un orden de magnitud, de manera tal que la actividad de fosfatasas de proteínas sobre R fosforilada es otro factor que influye en el equilibrio favoreciendo la reasociación con C. La constante de disociación del AMPc de R está en el orden de 10^{-8} M.

Los dos sitios de unión de AMPc a cada subunidad R probablemente son el resultado de duplicación génica. Se los ha designado sitios 1 y 2 o sitios B y A respectivamente; el sitio 1(B) representa la parte carboxi terminal de R y el sitio 2(A) es adyacente al sitio de pseudosustrato (región bisagra). La constante de velocidad de

disociación del sitio 1 para el AMPc es alrededor de un orden de magnitud menor que la del sitio 2, indicando una mayor afinidad del sitio 1 por AMPc; el sitio 2, bloqueado por la subunidad C en la holoenzima, se hace accesible al AMPc cuando este se ha unido al sitio 1. El uso de una batería de análogos del AMPc que presentan afinidad diferencial por los dos sitios de unión del nucleótido ha permitido un estudio detallado de las diferencias que presentan ambos sitios (Beebe y Corbin, 1986).

Otro factor a tener en cuenta en el estudio de la disociación de la PKA es el papel que juega el ATP-Mg: la activación de la holoenzima de tipo I se inhibe a concentraciones fisiológicas de ATP-Mg (la constante de disociación se reduce en más de tres órdenes de magnitud), es decir la unión de ATP-Mg estabiliza la holoenzima tipo I elevando el umbral de AMPc requerido para lograr su disociación; también ha sido informado que la unión de ATP-Mg previene la disociación de la holoenzima tipo I inducida por sal (Herberg y col., 1993). La subunidad RII no requiere ATP para la formación de una holoenzima estable.

4.1.3.4 El inhibidor específico de la PKA (PKI).

El descubrimiento por Walsh y colaboradores en el año 1971, de una proteína ácida y termoestable, que inhibe a la PKA con gran eficiencia (K_i alrededor de 0,2 nM) constituyó un hito importante en el estudio de esta fosfotransferasa; desde entonces y debido a su extrema especificidad el PKI ha sido utilizado como diagnóstico de la actividad PKA. La cadena polipeptídica del PKI contiene 75 aminoácidos (M_r 7829) (Scott y col., 1985 (a)) y su dominio inhibitorio está ubicado cerca del extremo amino terminal (Scott y col., 1985 (b); Cheng y col., 1985). Como en el caso de la subunidad RI, su capacidad inhibitoria está basada en un sitio de pseudosustrato ($^{18}R-R-N-A$, ver **tabla I-1**); se utilizan habitualmente formas truncadas del PKI de 18-20 aminoácidos (PKI 5-22 y PKI 5-24) que siguen siendo potentes inhibidores (K_i alrededor de 2nM) y conservan la especificidad de la molécula nativa.

La actividad inhibitoria del PKI depende de la presencia de ATP-Mg y es de tipo competitiva con respecto al sustrato; la unión de R y el PKI a C son mutuamente

excluyentes. El inhibidor bloquea la catálisis al interactuar con el complejo C/ATP-Mg en la misma forma que lo hace RI (Whitehouse y Walsh, 1983)

El hecho de que péptidos simples que contienen dominios de pseudosustrato sean pobres inhibidores de la actividad PKA, hace pensar que la alta eficiencia de los péptidos PKI 5-22 y 5-24 no puede explicarse simplemente por la existencia de aquellos dominios. Dos tipos de abordaje han permitido ahondar en el conocimiento de las estructuras primaria y secundaria del PKI que permiten explicar algunas de sus características; por un lado los estudios cinéticos con péptidos truncados de sus extremos amino y/o carboxi terminal han permitido determinar que el péptido mínimo que mantiene una buena potencia inhibitoria es el PKI 6-22 y que en general, su estructura primaria sugiere que la alta afinidad del inhibidor se debe al establecimiento de un alto número de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de tipo puente de hidrógeno con el sitio activo. También han surgido evidencias en el sentido de que algunos elementos de su estructura secundaria tendrían gran importancia en el establecimiento y estabilización de estas interacciones.

Debido a que el PKI es notablemente resistente a la desnaturalización por calor y por ácidos es sorprendente que tanto la proteína completa como sus péptidos menores tengan una estructura secundaria estable. Sin embargo, los estudios de dicroísmo circular (Reed y col., 1987) y resonancia magnética nuclear (Reed y col., 1989) han demostrado que la estructura secundaria del PKI es tal que permite la interacción con la subunidad C en varios sitios además del sitio de pseudosustrato; las características mas relevantes de su estructura son:

1. Una α hélice amino terminal, importante para la especificidad de la interacción y para el alineamiento de residuos como Phe¹⁰ de manera de optimizar las interacciones hidrofóbicas con la enzima.

2. La presencia de un potencial puente de hidrógeno entre el residuo Asn²⁰ y la zona mas básica de C.

3. La presencia de una o mas hojas plegadas β , ya que las sustituciones que disminuyen la formación de estas potenciales estructuras (por ej, Gly¹⁷ \rightarrow Leu, Ser¹³ \rightarrow Leu, Gly¹⁹ \rightarrow Ile) reducen sustancialmente la inhibición.

La cristalización de la subunidad C como complejo binario con PKI(5-24) y ternario con PKI(5-24) y nucleótidos confirmaron la presencia de estos elementos de estructura secundaria y aclararon las múltiples interacciones que resultan en tan firme unión al sitio activo (Knighton y col., 1991 (a) y (b)).

La relevancia fisiológica del PKI no está claramente establecida. La disponibilidad de PKI recombinante y la expresión deliberada del PKI en ciertas células podría proveer elementos para un mejor conocimiento de su significado biológico.

4.2 Función y control de la PKA.

Dada la enorme importancia regulatoria de la fosforilación de proteínas, es crucial para la célula poseer estrictos mecanismos de control que le permitan activar e inactivar las quinasas de proteínas de acuerdo a sus necesidades metabólicas. Esto es particularmente cierto en el caso de una enzima como la subunidad catalítica C de la PKA, relativamente abundante y que parece tener fácil acceso a diferentes compartimientos celulares en los cuales está involucrada en la regulación de eventos citosólicos y nucleares. Muchos de los aspectos intracelulares del control de la PKA son de conocimiento reciente y otros muchos siguen en estudio.

4.2.1 Control de la PKA *in vivo*.

La concentración intracelular de la PKA es alrededor de 0,2-0,7 μM y la relación molar entre las subunidades R y C es usualmente 1:1, aunque en ciertas circunstancias esta relación puede alterarse (Beebe y Corbin, 1986). Por otro lado la relación molar holoenzima tipo I/tipo II varía no sólo con el tipo de tejido y su fuente sino también en diferentes estadios de un mismo tipo celular; así, se ve un cambio en la relación entre los dos tipos de holoenzima durante el desarrollo, el crecimiento y diferenciación celular, transformaciones malignas etc., aunque no se ha logrado una asociación cierta de alguna de los dos holoenzimas con ninguno de estos complejos procesos.

El balance entre las dos subunidades ha merecido la atención de muchos estudios como uno de los mecanismos que la célula podría utilizar para regular en distintas circunstancias la actividad de la PKA. La vida media de la subunidad RI en hígado es de 31 h mientras que la de R II es 125 h indicando que R I sufre recambio mucho mas rápido que R II (Weber y Hilz, 1986); mas aún en un determinado tipo de holoenzima las subunidades R y C tienen una velocidad de recambio similar que se ha asociado a la sensibilidad de las subunidades libres a la degradación ya que se ha observado una mayor susceptibilidad tanto de R como de C libres a la degradación proteica (Alhanaty y col. 1981; Kinzel y col, 1987).

Se ha demostrado que la sobre expresión del ADN copia que codifica para la subunidad C provoca un aumento de varias veces en la cantidad de la subunidad RI sin que varíe el nivel de su ARN mensajero ni la cantidad de R II (Uhler y McKnight 1987); este resultado sugiere que la inducción de una expresión aumentada de RI puede representar un mecanismo al que apela la célula para neutralizar la subunidad C libre en exceso. Asimismo una sobre expresión de RI hace a la célula parcialmente resistente al AMPc, ya que R secuestra gran cantidad del nucleótido cíclico y se necesita una mayor concentración del mismo para lograr liberar una determinada cantidad de C.

La segunda herramienta que podría utilizar la célula para controlar específicamente a la PKA es el PKI. En músculo esquelético, por ejemplo, la cantidad de PKI es suficiente para inhibir el 20% de la subunidad C presente en este tejido. La forma en que el PKI y la subunidad R comparten el control de C no es completamente conocida. Una posibilidad es que el PKI se use para controlar la subunidad C libre hasta que pueda ser secuestrada por R, en particular por RI recién sintetizada. También es posible que el PKI sea usado para controlar C libre en circunstancias en las que R tiene baja afinidad por C debido a AMPc unido o en ciertos lugares de la célula que no puedan ser alcanzados por el dímero de R, por ejemplo, posiblemente el núcleo.

4.2.2 Localización subcelular de la PKA.

4.2.2.1 Proteínas de anclaje.

Las holoenzimas de tipo I y II se encuentran usualmente en el citosol; pero, mientras la enzima tipo I se encuentra siempre en la fracción soluble de la célula, la de tipo II se encuentra frecuentemente asociada a fracciones particuladas de las que puede extraerse mediante el uso de detergentes no iónicos. Se ha demostrado que la enzima tipo II es anclada en organelas citoplasmáticas por proteínas específicas que interactúan con la subunidad RII en su forma dimérica (Scott, 1991; Hubbard y Cohen, 1993). La primera proteína de anclaje identificada fue la asociada a microtúbulos (MAP2)² que parece mediar la asociación de la enzima a microtúbulos; posteriormente se descubrieron otras que direccionan la holoenzima tipo II a elementos del citoesqueleto, complejo de Golgi y centrosoma. Las proteínas de anclaje se unen, a través de una hélice anfipática ubicada en su extremo amino terminal, al dímero de RII con afinidad en el orden nanomolar. La unión de la PKA vía estas proteínas de anclaje a compartimientos específicos en la célula garantizarían la fosforilación preferencial de sustratos cercanos al sitio de anclaje y podría explicar ciertos aspectos de la especificidad y selectividad de sustratos *in vivo*; las proteínas de anclaje pueden considerarse como un elemento adicional de control de la actividad PKA que restringen su actividad a ciertos compartimientos celulares.

4.2.2.2. Translocación al núcleo.

El mecanismo por el cual el AMPc afecta eventos nucleares como la actividad transcripcional de genes eucariotas ha sido motivo de estudio desde hace muchos años (Nigg, 1990). Haciendo una analogía con la proteína CAP de procariotas, se ha discutido el rol probable de la subunidad R de la PKA en la regulación de la

² MAP2, del inglés "microtubule-associated- protein-2", proteína asociada a microtúbulos.

transcripción; también se ha analizado la probabilidad de que ciertos eventos nucleares sean mediados por la subunidad C.

Existen firmes evidencias que favorecen la función de C en el núcleo. Cuando el nivel de AMPc intracelular se mantiene aumentado por largo tiempo, la subunidad C se transloca al núcleo mientras R permanece fuera del mismo; C acoplada a marcadores fluorescentes, microinyectada en el citoplasma también se transloca rápidamente al núcleo (Fantozzi y col., 1992). El mecanismo de translocación no se conoce con exactitud; la mayoría de las proteínas con destino nuclear poseen secuencias específicas de localización que no se han detectado hasta ahora en C. El hecho de que al bajar los niveles de AMPc se haya observado que la subunidad C puede regresar al citoplasma sumado a otras observaciones adicionales, hacen pensar que muy probablemente la translocación de C pueda explicarse por difusión. Experimentos de microinyección han demostrado que el PKI también puede entrar al núcleo y se propone que podría controlar no sólo la actividad de C sino también su salida del núcleo (Fantozzi y col., 1994).

Si bien no se puede descartar la posibilidad de que la subunidad C tenga influencia en eventos nucleares mediante la fosforilación en el citoplasma de algún factor que sea luego transportado al núcleo, la translocación de C al núcleo parece representar un paso importante en un camino de transducción de señales que regule la actividad génica. La respuesta transcripcional a la elevación del AMPc intracelular en eucariotas está localizada en una familia de secuencias específicas en el ADN llamadas secuencias CRE³; estas secuencias están localizadas en la región promotora de varios genes y contienen la secuencia consenso TGACGTCA. En células que responden a un aumento del AMPc existe una familia de proteínas que se une a estos segmentos; una de ellas, la proteína CREB⁴, una vez fosforilada interviene en la transactivación de los genes que responden al AMPc. La estequiometría y la cinética de fosforilación de CREB está estrechamente correlacionada con la entrada de C al núcleo (Hagiwara y col, 1993).

³ CRE, del inglés "cAMP-response element", elemento que responde a AMPc.

⁴ CREB, del inglés "cAMP-response element binding", proteína de unión a CRE.

Más recientemente se ha planteado también la existencia de un rol importante propio de la subunidad R en eventos nucleares (Cho-Chung, 1993).

4.3. Aspectos estructurales de la actividad de PKA.

4.3.1. Reconocimiento del sustrato.

La secuencia de reconocimiento del sustrato por la PKA, como ya fue comentado al inicio de esta sección consiste fundamentalmente en dos residuos básicos y el aminoácido receptor del fosfato separado de los primeros hacia la zona C terminal por uno o dos residuos de cualquier tipo. Los estudios realizados utilizando como sustrato péptidos sintéticos no alcanzan a explicar cuales son las interacciones entre la enzima y sus verdaderos sustratos que le permite a la primera ser tan selectiva siendo tan limitado el número de elementos de reconocimiento requerido.

Los estudios de dicroísmo circular realizados por Reed y Kinzel en 1984 (a y b), utilizando los complejos enzima-sustrato y enzima-pseudosustrato combinados con los estudios cinéticos con péptidos análogos (Reed y col., 1985) han permitido elaborar un esquema del acomodamiento del sustrato al sitio activo en la primera etapa de la reacción:

1. En el primer contacto de reconocimiento se establecen solamente uniones iónicas débiles entre los residuos básicos del sustrato y cargas negativas de la enzima acompañadas por el desenrollamiento de una porción de la α hélice de la enzima para dar una espiral extendida.

2. Si la conformación del sustrato en la vecindad de la serina o treonina blanco puede adoptar la forma de una espiral extendida, se establece una unión más firme.

3. Finalmente si un grupo hidroxilo del aminoácido blanco se encuentra en la posición correcta, se produce una reorientación de una tirosina de la enzima, probablemente se excluye agua del sitio de transferencia del fosfato y se forma una estructura de hoja β plegada a expensas de la espiral extendida. El efecto final de la

unión del sustrato es aumentar notablemente el establecimiento de estructuras más estables y ordenadas.

Existen entonces al menos tres interacciones mínimas para que el sistema esté en condiciones de funcionar normalmente. Es importante notar que si los dos primeros pasos tiene lugar pero no el tercero, como ocurre en el caso en que el péptido tiene alanina en lugar de serina, el ligando ha sido unido firmemente a la enzima pero los pasos previos a la catálisis no ocurren y el análogo se comporta como un inhibidor competitivo del sustrato.

4.3.2. Estructura de la subunidad C.

La resolución de la estructura cristalina de la PKA formando complejo binario con el péptido inhibidor y ternario con pseudosustratos y nucleótidos que se comentó al hablar de la estructura del PKI, permitió conocer también la enzima en su conformación activa (Bossemeyer y col., 1993; Zheng y col., 1993). La estructura cristalina de la PKA sirvió de modelo para el análisis de la gran familia de las quinasas de proteínas y permitió ahondar en los mecanismos de acción, los roles de los residuos conservados y los aspectos regulatorios de esta gran familia de proteínas.

4.3.2.1. El dominio catalítico conservado.

Para el estudio de las secuencias primarias de las quinasas de proteínas de eucariotas se adoptó el análisis de Hanks y col., (1988), en el cual se alinearon los dominios conservados de las distintas secuencias conocidas hasta el momento con los de la PKA (el número de quinasas de proteínas conocidas ha aumentado enormemente desde entonces). El dominio conservado de las quinasas resulta dividido por regiones de baja conservación, en 11 subdominios (**figura I-3**); obviamente es de esperar que las secuencias compartidas en los subdominios conservados sean importantes para el mecanismo catalítico, formando parte del sitio activo o contribuyendo a su estructura. Dentro del dominio catalítico se distinguen dos grandes grupos, la familia de las serina

/treonina quinasas y la de las tirosina quinasas, caracterizadas por segmentos cortos de aminoácidos específicos. El dominio catalítico conservado de las quinasas de proteínas, que comprende unos 260 residuos, contienen mas de diez aminoácidos conservados invariantes o casi invariantes que probablemente posean un rol común. Los estudios bioquímicos y genéticos realizados en los últimos 20 años junto con los datos aportados por la cristalografía han permitido un detallado conocimiento de la enzima y han permitido modelar su estructura en acuerdo con los resultados obtenidos por los distintos enfoques aplicados a su estudio.

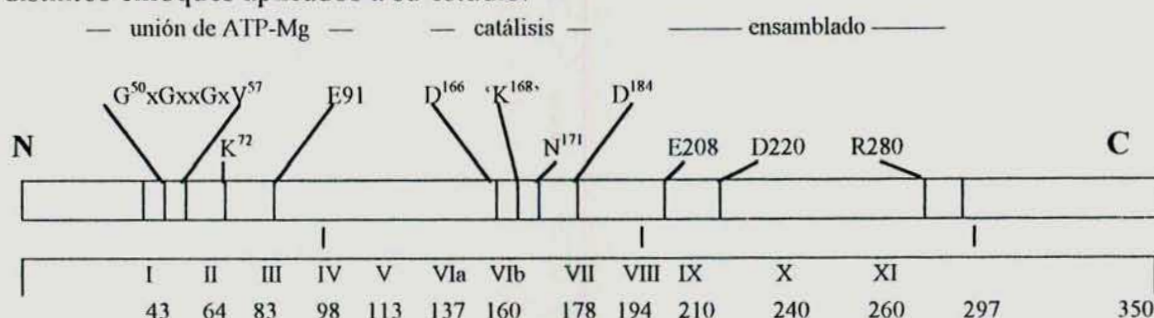


Figura I-2. Estructura primaria de la subunidad C de la PKA. Se señalan las regiones conservadas del dominio catalítico. La numeración de los subdominios en números romanos es tomada de Hanks y col., 1988.

4.3.2.2 Estructura terciaria de C.

La estructura terciaria del dominio catalítico consiste en dos estructuras lobulares separadas por un surco que es ocupado por el sustrato; en la **figura I-3** se muestra un esquema simplificado de la topología de la subunidad C, (A) y el modelo tridimensional propuesto para su dominio catalítico, (B). Este dominio se inicia con la cadena β 1 en el lóbulo menor y termina en la Arg²⁸⁰ en el lóbulo mayor; dentro de este dominio conservado hay 9 aminoácidos invariantes y varios residuos altamente conservados.

El segmento conservado rico en glicina (Gly⁵⁰-Thr-Gly⁵²-Ser-Phe-Gly⁵⁵) está involucrado en la unión del ATP-Mg. Otra región altamente conservada, quizá la mas importante, se extiende desde la Arg¹⁶⁵ hasta la Asn¹⁷¹ y se denomina 'loop' catalítico;

este 'loop' dirige el evento catalítico mismo y guía al péptido a su orientación correcta para que pueda ocurrir la catálisis, siendo la Asp¹⁶⁶ considerada la base catalítica que sustrae el protón del grupo hidroxilo haciendo mas nucleofilico el oxígeno de la serina.

En la **tabla I-2** se resumen las funciones más probables propuestas para los residuos considerados clave en el dominio catalítico de la subunidad C.

Tabla I-2. Asociación estructural y funciones probables de los residuos invariantes de la subunidad C.

Residuo	Asociación estructural	Función probable
Gly ⁵⁰	Secuencia rica en glicina	Provee lugar para la ribosa
Gly ⁵²	Secuencia rica en glicina	Provee lugar para el fosfato β
Val ⁵⁷	Interacción hidrofóbica con la adenosina	Parte del bolsillo del nucleótido
Lys ⁷²	Coordina los oxígenos de los fosfatos α y β del ATP	Ubicación estereoquímica del grupo trifosfato
Glu ⁹¹	Interacciona con Lys ⁷²	Junto con Lys ⁷² ubicación del trifosfato
Asp ¹⁶⁶	Contacta el sustrato seril-OH	Base catalítica
Lys ¹⁶⁸	Contacta el fosfato γ transferido	Estabilización de un intermediario pentacoordinado
Asn ¹⁷¹	Coordina α y β fosfatos	
Asp ¹⁸⁴	Coordina β y γ fosfatos	Ubicación estereoquímica del fosfato γ
Glu ²⁰⁸	Puente salino con Arg ²⁸⁰	Ensamblado del dominio catalítico
Asp ²²⁰	Puentes de hidrógeno con los residuos del loop catalítico	Ensamblado del loop catalítico
Arg ²⁸⁰	Puente salino con Glu ²⁰⁸	Ensamblado del dominio catalítico

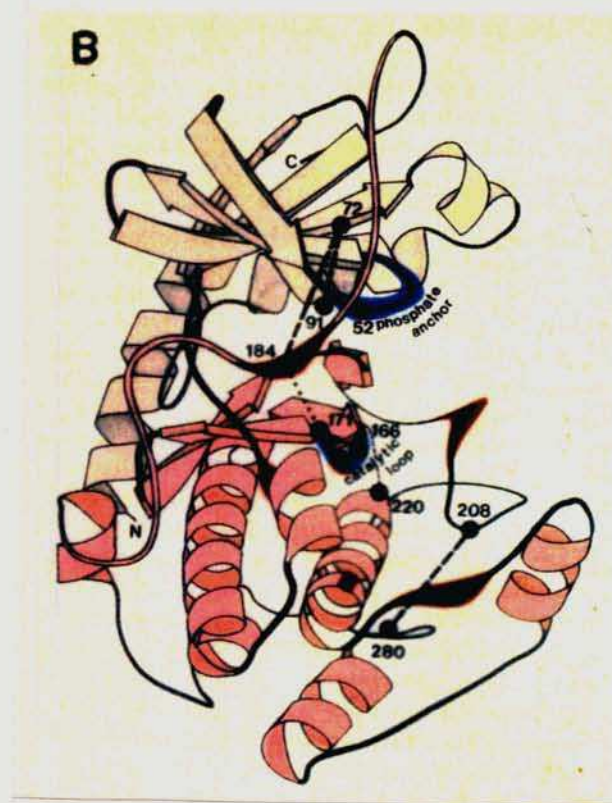
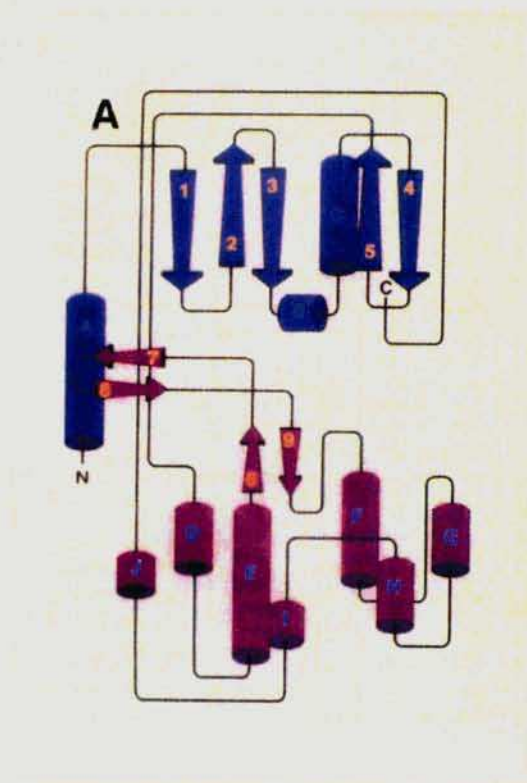


Figura I-3. A. Topología de la subunidad C. Los aminoácidos correspondientes a las estructuras secundarias son: para las hojas plegadas β , 1, 43 a 48; 2, 57 a 63; 3, 67 a 75; 4, 106 a 111; 5, 115 a 120; 6, 161 a 164; 7, 171 a 175; 8, 178 a 183; 9, 188 a 191; para las hélices α , A, 15 a 31; B, 76 a 82; C, 84 a 97; D, 128 a 135; E, 140 a 159; F, 218 a 233; G, 244 a 252; H, 263 a 272; I, 288 a 293; J, 301 a 307. N, amino terminal; C, carboxi terminal. **B. Modelo tridimensional del dominio catalítico conservado de C.** Diagrama en cinta mostrando el plegamiento de la subunidad C. Las regiones conservadas incluyen 2 loops, loop rico en glicina y el loop catalítico que se indican en azul. Los sitios de unión a péptido se muestran en rojo. Los aminoácidos invariantes Gly⁵², Lys⁷², Glu⁹¹, Asp¹⁶⁶, Asn¹⁷¹, Asp¹⁸⁴, Glu²⁰⁸, Asp²²⁰ y Arg²⁸⁰ son indicados por un punto y numerados. Las líneas rayadas indican los aminoácidos cercanos, la línea punteada se extiende desde la Arg¹⁶⁵ a la Thr¹⁹⁷. Tomados de Knighton y col, 1991.

4.3.2.3. Modificaciones postraduccionales.

Miristoilación.

Como ya fue mencionado la subunidad C de la PKA está miristoilada en su glicina amino terminal. La estructura cristalina de alta resolución de la subunidad C de corazón porcino muestra que el ácido mirístico está plegado en la proteína dentro de un bolsillo hidrofóbico entre la hélice α amino terminal y la superficie del lóbulo mayor; la miristoilación se asocia a una mayor estabilidad térmica de la proteína (Bossemeyer, 1993).

Fosforilación

Muchas quinasas de proteínas son ellas mismas sustratos fosforilables. Algunas de estas fosforilaciones son eventos regulatorios positivos y otras negativos. Como ya se dijo la fosforilación de la subunidad C en Thr¹⁹⁷ parece ser necesaria para la maduración de la enzima mas que para su regulación reversible (Steinberg y col., 1993). En la estructura cristalina del complejo ternario el grupo fosfato de la Thr¹⁹⁷ interactúa con varios residuos del lóbulo mayor y del menor y por su ubicación resulta prácticamente inaccesible a las fosfatasas; probablemente su papel en proveer una quinasas activa esté en facilitar el correcto ensamblado del sitio activo.

4.4. PKA en eucariotas inferiores.

Han sido descriptas actividades de PKA en varios eucariotas inferiores. La mayor parte de estas enzimas mostraron características funcionales similares a las descriptas para las PKAs de eucariotas superiores. La gran mayoría de las holoenzimas caracterizadas presentaron estructura tetramérica a excepción de las PKAs de *D. discoideum* (De Gunzburg y col., 1984) y de *Saccobolus platensis* (Silberstein y col., 1990). En *D. discoideum*, se ha informado la existencia de una subunidad catalítica con

un segmento amino terminal extra de 332 aminoácidos que le otorga a la proteína una masa molecular inusualmente elevada para C (73 kDa) (Anjard y col., 1993).

En *S. cerevisiae* se describió un sólo tipo de PKA comparable a la isoenzima de tipo II de mamífero (Hixson y Krebs, 1980). Estudios posteriores demostraron que existen en la levadura tres genes diferentes que codifican para la subunidad catalítica (TPK1, TPK2 y TPK3) y un único gen responsable de la expresión de la subunidad regulatoria (Toda y col., 1987).

En el hongo dimórfico *Mucor rouxii* la PKA eluye de una columna de DEAE-celulosa como las holoenzimas de tipo II de eucariotas superiores (Moreno y Passeron, 1985). Presenta la peculiaridad de no disociarse por la sola presencia del nucleótido cíclico, requiriendo además el agregado del sustrato o de CINA.

En el hongo acuático *Blastocladiella emersonii* se ha descrito la existencia de una única forma de PKA similar al tipo II (Brochetto-Braga y col., 1982). La PKA está compuesta por dos subunidades catalíticas y un dímero regulatorio; ambas subunidades son codificadas por genes únicos (Marques y col., 1992 (b)).

5. Proteína quinasa CK2.

5.1. Características bioquímicas.

La proteína quinasa CK2 (CK2) es una Ser/Thr quinasa que se encuentra ubicuamente distribuida en los organismos eucariotas.

La holoenzima aislada de muy diferentes fuentes es un tetrámero constitutivamente activo con un peso molecular aproximado de 130 kDa. El tetrámero de la CK2 humana está compuesto por dos subunidades catalíticas (α y/o α') y dos subunidades regulatorias (β) con masas moleculares de 43 kDa (α), 38 kDa (α') y 28 kDa (β). Tanto la estructura tetramérica como las masas moleculares de las subunidades se encuentran altamente conservadas en los distintos organismos. Sin embargo, algunos organismos parecen no tener la subunidad α' como en el caso de *Caenorhabditis elegans*

(Hu y col., 1990) o *Drosophila melanogaster* (Saxena y col., 1987), mientras otros poseen una adicional subunidad β (β') como en *S. cerevisiae* (Glover y col., 1994).

En los últimos años ha habido un dramático aumento en el número de sustratos de CK2 identificados; hasta el momento más de 100 proteínas han sido reportadas. Entre algunos de estos sustratos se incluyen factores de transcripción, productos oncogénicos (c-Jun, c-Myc), proteínas supresoras de tumores, proteínas involucradas en transducción de señales (PKA, subunidad R; PKC; receptor de insulina; calmodulina), factores de la síntesis de proteínas, proteínas estructurales y de citoesqueleto. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de sustratos y de la importancia fisiológica de los mismos, el rol preciso de esta enzima en los procesos biológicos permanece pobremente caracterizado, aunque numerosas y recientes evidencias indican que esta enzima estaría involucrada en la regulación de eventos proliferativos.

El motivo reconocido por la CK2 en sus sustratos es del tipo X-S/T-X-X-E/D. Ambos E y D pueden ser reemplazados por fosfo-serina o fosfo-treonina como determinantes específicos. El motivo contiene usualmente un grupo de residuos ácidos hacia el extremo C-terminal que favorecen fuertemente la fosforilación; los residuos básicos en esta posición son determinantes negativos. También son determinantes negativos una prolina ubicada en posición +1 o un duplete de residuos hidrofóbicos en las posiciones +1 y +2. Las secuencias que favorecen la formación de estructuras del tipo hoja plegada β optimizan la eficiencia de fosforilación.

Una propiedad inusual de esta quinasa es la capacidad de utilizar el GTP como cosustrato además del ATP (K_m aparente 20 μ M y 10 μ M respectivamente). También puede utilizar otros nucleósidos trifosfatos de purinas como el ITP y su respectivo deoxinucleótido de purina, pero no es capaz de utilizar nucleósidos trifosfatos de pirimidinas (Pieyrin y col., 1987).

La actividad de CK2 no es afectada por los clásicos segundos mensajeros como los nucleótidos cíclicos, fosfatidil inositol fosfatos o Ca^{+2} . La actividad es estimulada por compuestos polibásicos. Las poliaminas, espermina y espermidina, estimulan la actividad de 2 a 3 veces, mientras que los péptidos polibásicos como la polilisina afectan la actividad en forma variable dependiendo del sustrato fosforilado. Por ejemplo, en el caso

de la calmodulina el requerimiento de polilisina para su fosforilación por CK2 es absoluto (Pinna, 1994). En contraste, compuestos polianiónicos inhiben la actividad de CK2. El inhibidor más potente es la heparina (I_{50} aproximadamente 1.4 nM), otros péptidos ácidos como 2,3-bifosfoglicerato, derivados de benzimidazol o de folilpoliglutamato son también inhibidores (Pinna, 1990). el ADN tanto doble como simple cadena es también inhibitorio de la actividad de manera no específica de secuencia (Gatica y col., 1995).

Las proteínas pueden ser fosforiladas por ambas subunidades catalíticas, mientras que la presencia de la subunidad β aumenta o disminuye significativamente la fosforilación. Otro grupo de proteínas no es fosforilado por la subunidad catalítica sola pero se transforman en sustratos en presencia de la subunidad regulatoria (Bodenbach y col., 1994).

5.2. Rol fisiológico de la CK2.

La CK2 es una quinasa de proteínas con una considerable importancia en la fisiología de la célula ya que como hemos dicho se encuentra ampliamente distribuida en los organismos eucariotas y por otro lado ha sido extraordinariamente conservada en la evolución. No sólo ha sido conservada la estructura tetramérica de la holoenzima y la secuencia de sus subunidades sino también la estructura de sus genes.

Existen una gran cantidad de evidencias que sugieren un importante rol de la CK2 en los eventos de proliferación. En particular, ciertos estudios indican que la actividad de CK2 es mayor en células en activa proliferación comparada con la actividad en células quiescentes y en tejidos de tumores proliferativos comparados con tejidos no tumorales. Evidencias más directas de la implicancia de la CK2 en la proliferación surgen de los estudios realizados en *S. cerevisiae* donde se demostró que la disrupción de los 2 genes que codifican para las subunidades α y α' resulta en la completa pérdida de viabilidad la cual puede ser recuperada por transformación con el ADNcopia que codifica para la subunidad α de *D. melanogaster* (Padmanabha y col., 1990).

Otro argumento que sustenta un rol central de la CK2 en el control de las funciones celulares es provisto por el alto número, la variedad y la importancia de sus sustratos. Un análisis de los sustratos de la CK2 revela que varios de ellos son proteínas que involucran la expresión génica y la síntesis de proteína, lo cual apoya el concepto de que la CK2 jugaría un importante rol en los procesos de proliferación celular.

La fosforilación por CK2 puede afectar el comportamiento biológico de las proteínas directa o indirectamente. Efectos indirectos son aquellos en los cuales las proteínas se vuelven blanco de otras quinasas después de haber sido fosforiladas por CK2, en este caso si bien la primera fosforilación no produce cambios en el comportamiento biológico del sustrato la segunda si lo hace.

Por otro lado, la secuencia consenso de fosforilación por CK2 puede contener fosfo-Tyr o fosfo-Ser en posiciones claves, por lo tanto las proteínas pueden ser previamente fosforiladas por tirosina o serina quinasas para convertirse en sustratos de CK2. Estas fosforilaciones interdependientes forman la base para la interacción entre CK2 y otras proteínas quinasas. Es esta versatilidad la que hace a la CK2 un elemento potencialmente importante en la complicada trama de procesos celulares como la transducción señales.

OBJETIVOS

Uno de los principales objetivos de nuestro laboratorio es el estudio de las vías de señalización celular involucradas en la diferenciación de *C. albicans*. Dado que trabajos anteriores de nuestro laboratorio demostraron que las hormonas peptídicas como el glucagon, hLH y hCG activan la vía de transducción de señales que involucra al AMPc como segundo mensajero y que las fluctuaciones en los niveles intracelulares del nucleótido cíclico están estrechamente ligadas al proceso morfogénico en *C. albicans* se decidió investigar cuidadosamente la acción del glucagon y de derivados del AMPc durante la transición levadura-micelio.

Los resultados de esta investigación, que conforman la primera parte de este trabajo, confirmaron la participación del AMPc en el proceso de diferenciación. Con el objetivo de ahondar en el estudio bioquímico y molecular tendiente a dilucidar los mecanismos mediante los cuales el AMPc ejerce su acción como mediador endógeno en la morfogénesis, se encaró el estudio y la caracterización de la PKA, blanco universal del nucleótido cíclico en todos los organismos eucariotas estudiados hasta el momento. Este estudio abarcó la caracterización estructural y bioquímica de la holoenzima y la purificación de sus subunidades. Por otra parte se evaluó la posible modulación de la actividad de la PKA por fosforilación de su subunidad regulatoria tanto por C como por CK2 homóloga.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Crecimiento, mantenimiento y morfogénesis de *C. albicans*.

1.1. Cultivo y mantenimiento de la cepa.

Durante la realización de este trabajo se utilizó la cepa 1001 de *C. albicans* (ATCC 64385) cedida por el Dr. C. Nombela de la Universidad Complutense de Madrid, España. La cepa se mantuvo en picos de flauta en medio Sabouraud agarizado, repicándose cada 30 días en el mismo medio. Para salvaguardar la cepa de mutaciones espontáneas se la alicuotó en medio Sabouraud líquido conteniendo 50 % glicerol y se la guardó a -70°C.

1.2. Crecimiento levaduriforme de *C. albicans*.

Para la obtención de cultivos levaduriformes se inocularon en medio de Soll y Bedell células de *C. albicans* crecidas en medio sólido. Los cultivos fueron incubados a 28°C, con agitación orbital de 200 rpm manteniendo una relación atmósfera:medio de cultivo de 4:1.0, indistintamente, en una plancha de movimiento lateral en frascos Fernbach con igual relación atmósfera:medio de cultivo. El tiempo de incubación fue de 14 horas para la obtención de cultivos en fase logarítmica tardía y de 3 días para cultivos en fase estacionaria.

1.3. Métodos para inducir la formación de tubos germinativos.

1.3.1. Inducción de la germinación en medio de Soll y Bedell.

La morfogénesis inducida por temperatura se realizó de acuerdo a las descripciones metodológicas de Soll y Bedell (1978). La metodología es sencilla y el

porcentaje de germinación que se obtiene es alto; esta técnica fue utilizada para la obtención del micelio empleado en los experimentos de caracterización de la PKA.

Se creció el cultivo hasta fase estacionaria en medio de Soll y Bedell y se diluyó en el mismo medio recién preparado y precalentado a 37 °C a una concentración final de 2×10^6 células por ml. El cultivo fue incubado a 37 °C durante 90 min obteniéndose un porcentaje de germinación del 100 %; el micelio fue cosechado por centrifugación.

1.3.2. Inducción de la germinación en medio inductor de la germinación (MIG).

Esta técnica fue utilizada en los experimentos realizados para el estudio del efecto del glucagon y de los nucleótidos sobre la morfogénesis de *C. albicans*.

Células crecidas hasta fase estacionaria en medio de Soll y Bedell fueron lavadas dos veces en agua destilada y resuspendidas en medio MIG a una concentración de 6×10^6 células por ml. Los inductores utilizados, NAcGlc o suero, fueron agregados a las concentraciones indicadas en cada experimento y los cultivos fueron incubados a 37 °C con agitación. El AMPc, el dbAMPc, el GTPγS, la teofilina o el glucagon fueron agregados a las concentraciones finales indicadas cuando fue requerido.

Para la evaluación del efecto de los inductores sobre el compromiso a formar tubos germinativos se siguió el siguiente protocolo: las células previamente incubadas en medio MIG durante 45 min a 37 °C en presencia del inductor (NAcGlc 5 mM o suero 7,5 %) fueron centrifugadas y resuspendidas en medio fresco, la incubación se prosiguió durante 60 min a 37 °C y se determinó el porcentaje de germinación.

En los experimentos diseñados para discriminar entre la estimulación de la formación de tubos germinativos y el crecimiento hifal, el inductor (0,5 mM NAcGlc) fue lavado luego de 45 min de incubación a 37 °C; los compuestos a ser testados fueron agregados en las concentraciones indicadas en cada experimento y la incubación se continuó durante 60 min a 37 °C.

En los experimentos realizados para observar el efecto de los anticuerpos anti glucagon sobre la actividad estimuladora de la hormona, el glucagon a una concentración de 100 nM fue preincubado sólo o en presencia de diferentes diluciones

de los anticuerpos durante 60 min a 37 °C en un volumen final de 100 µl de medio MIG conteniendo suero 1,5 %; después de la preincubación, se agregaron las células en un volumen de 100 µl de medio fresco a una concentración de 12×10^6 células por ml y la incubación fue continuada durante 90 min a 37 °C .

En todos los casos el porcentaje de germinación fue evaluado bajo microscopio óptico utilizando un hemocitómetro. Se consideró como célula germinada aquella que había emitido un tubo germinativo cuyo largo fuera al menos igual al diámetro de la levadura madre. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y al menos 200 células fueron cuantificadas.

Las microfotografías se tomaron con una cámara Nikon M-35S acoplada a un microscopio Nikon Microphot Fx.

1.4. Medios de cultivo

1.4.1. Medio descrito por Soll y Bedell.

El medio de cultivo descrito por Soll y Bedell (1978) contiene : glucosa 10 g, bactopectona 10 g, extracto de levadura 1 g, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, PO_4HK_2 1 g y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 2,2 g por litro de agua destilada.

1.4.2. Medio inductor de la germinación (MIG).

El medio mínimo definido descrito por Pollack y Hashimoto (1987) contiene : SO_4Fe 0,1 mg, ClK 0,4 g, SO_4Mg 0,2 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,125 g, ClNa 6,4 g, CO_3HNa 0,75 g por litro de buffer Hepes 50 mM pH 6,8.

El medio MIG sin fosfatos tiene similar composición que el anterior excepto que el $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ ha sido omitido.

1.4.3. Medio Sabouraud.

Este medio es comercializado como caldo-glucosa 2% Sabouraud y su composición es peptona de carne 10 g, glucosa 20 g por litro de agua destilada; el pH del medio de cultivo es de 5,6.

2. Preparación de extractos de *C. albicans*.

Todas las operaciones fueron llevadas a cabo a 4°C. Las células de los diferentes estadios mórficos fueron cosechadas por centrifugación, lavadas 2 veces con agua destilada y resuspendidas en el buffer de homogenización correspondiente.

2.1. Extractos solubles para purificación de las enzimas.

Las células cosechadas fueron resuspendidas en buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,8; EGTA 1 mM; EDTA 1mM; β -mercaptoetanol 10 mM e inhibidores de proteasas (buffer A). Los extractos crudos se obtuvieron por ruptura de las células en French pressure cell a 70 Mpa seguido por una centrifugación a 5000 x g durante 15 min. Finalmente, el extracto se clarificó por centrifugación a 100000 x g durante 45 min y al sobrenadante obtenido se lo denominó fracción S100. Este método de preparación de extractos permite procesar una cantidad importante de células, obteniéndose una muy buena extracción de proteínas por lo cual fue usado fundamentalmente para las etapas de purificación de las enzimas.

2.2. Extractos solubles para técnicas inmunológicas.

Los extractos solubles para los experimentos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo por vortexeo de las células en presencia de perlas de vidrio. Para ello se agregaron 2 volúmenes de perlas de vidrio por cada volumen de células centrifugadas, más dos volúmenes del buffer Tris HCl 50 mM pH 8,1; Tween 20 0,1 %; ClNa 150 mM;

inhibidores de fosfatasa e inhibidores de proteasas (buffer B), la mezcla fue vortexeada durante 1 min y se dejó enfriar en hielo durante 1 min, este ciclo se repitió 8 veces. Finalmente se centrifugó a 5000 x g durante 15 min y se guardó el sobrenadante.

En el caso de los extractos para ensayos de Western blot, éstos se realizaron en forma similar a la descrita para la inmunoprecipitación o, alternativamente, se prepararon por calentamiento de las células centrifugadas directamente en solución de Laemmli 1 x durante 15 min a 100 °C, con el fin de minimizar la proteólisis.

2.3. Inhibidores de proteasas.

Los inhibidores de proteasas utilizados fueron: antipaina 20 µg/ml; leupeptina ; 20 µg/ml, pepstatina 20 µg/ml; PMSF 1mM; benzamidina 20 mM

2.4. Inhibidores de fosfatasa.

Como inhibidores de fosfatasa se incluyeron en las soluciones fluoruro de sodio 50 mM, glicerofosfato de sodio 150 mM y vanadato de sodio 100 µM.

3. Cromatografía en Mono Q de extractos de *C. albicans*.

Todas las operaciones se realizaron a 4 °C. La fracción S100 (15 mg de proteína) fue sembrada por inyección en una columna de Mono Q HR5/5 (sistema FPLC) previamente equilibrada en buffer A. La columna se lavó con dos volúmenes del mismo buffer y la proteína retenida se eluyó aplicando un gradiente lineal de 0-400 mM ClNa (20 ml) a un flujo de 0,3 ml/min. Se recogieron fracciones de 300 µl y se midió capacidad ligante de AMPc y actividad de PKA en alícuotas apropiadas de cada fracción. Alícuotas de las fracciones activas fueron sometidas a análisis de fosforilación endógena (ver sección M-8.3.), marcación con 8-azido-AMPc [³²P] (ver sección M-8.4.) e inmunorreactividad contra el antisuero anti C de *B. emersonii* (ver sección M-9.2.).

4. Purificación parcial de la PKA de *C. albicans*.

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C. La fracción S100 (1 g de proteína) fue sembrada en una columna DE-52 (2 x 30 cm) previamente equilibrada en buffer A. La columna fue lavada con 5 volúmenes del mismo buffer y la proteína retenida se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente lineal de 0-300 mM ClNa. Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna y se midió la capacidad ligante de AMPc y la actividad de PKA en alícuotas apropiadas de cada fracción. Las fracciones con actividad de PKA y capacidad ligante de AMPc que eluyeron a 150 mM ClNa se reunieron y se concentraron por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta un 80 % de saturación.

El precipitado se resuspendió en buffer A conteniendo ClNa 150 mM, se dializó contra la misma solución y se clarificó por centrifugación. La solución resultante de aproximadamente 5 mg/ml de proteína se sembró en una columna de Sephacryl S300 (1 x 60 cm) equilibrada en el mismo buffer, el volumen de siembra fue del 1-2 % del volumen de la columna. La proteína se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 4,5 ml/hora y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones con actividad de PKA se reunieron y se concentraron aproximadamente hasta 500 µl en concentradores Centricon 100; la preparación se guardó en alícuotas de 25 µl a -20 °C en presencia de 20 %(v/v) glicerol. Esta preparación fue estable por varias semanas y fue utilizada para la caracterización de la PKA de *C. albicans*.

En los casos en que se requirieron preparaciones de holoenzima completamente libres de subunidad R la fracción obtenida a través del tamiz molecular fue sometida a un paso adicional de purificación a través de gradiente de sacarosa (detalles de la preparación de los gradientes en la sección M-7.1.). Las fracciones de los gradientes con actividad de PKA fueron reunidas, alícuotadas y guardadas a 20 °C en presencia de 20 %(v/v) glicerol.

5. Purificación de la subunidad regulatoria.

Todos los pasos se realizaron a 4 °C. La fracción S100 (1,4 g de proteína) fue sembrada en una columna de DE-52 (2 x 30 cm) equilibrada en buffer A. La columna fue lavada con 5 volúmenes de buffer A y la holoenzima fue eluída con un gradiente lineal de 0-300 mM ClNa en buffer A. Las fracciones con actividad de PKA y capacidad ligante de AMPc fueron reunidas y sembradas en una columna de AMPc agarosa (2 ml) equilibrada en buffer A conteniendo 150 mM ClNa. La actividad de unión de AMPc fue retenida en la columna mientras que la actividad fosfotransferasa percoló. La columna fue sucesivamente lavada con 10 ml de buffer A conteniendo ClNa 2 M, 10 ml de buffer A conteniendo AMP 10 mM y finalmente con 10 ml de buffer A conteniendo ATP 10 mM. A continuación la columna fue desarmada y la subunidad R fue eluída por incubación de la resina con 2 ml de buffer A conteniendo AMPc 10 mM durante 180 min a 4 °C con agitación. Al cabo de este tiempo la suspensión se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. El procedimiento de elución se repitió una vez más pero la incubación fue de 12 horas.

En algunas purificaciones se agregó al buffer de elución 0,1 mg/ml de albúmina bovina debido a que se observó un aumento en el rendimiento, probablemente causado por un efecto protector de la albúmina sobre la proteólisis de la subunidad regulatoria.

Los sobrenadantes se reunieron y se dializaron durante 36 horas contra buffer A, cambiando el buffer cada 6 horas aproximadamente. Esta preparación fue concentrada aproximadamente a 300 µl con concentradores Centricon 10, se agregó 20 %(v/v) glicerol, se fraccionó en alícuotas de 20 µl y se guardó a -20 °C.

6. Purificación de la subunidad catalítica.

La purificación fue llevada a cabo a 4 °C de acuerdo a lo descrito por Reimann y Beham, (1983). La fracción S100 (1 g de proteína) fue sembrada en una columna de DE-52 (2 x 30 cm) equilibrada en buffer A. La columna fue lavada con 5 volúmenes de buffer fosfato de sodio 55 mM pH 6,8 y la subunidad catalítica fue eluída por el

agregado de 50 ml de buffer fosfato de sodio 45 mM pH 6,8 conteniendo AMPc 0,2 mM. Las fracciones conteniendo actividad de quinasa fueron reunidas y sembradas en una columna de hidroxapatita (5 ml) equilibrada en buffer fosfato 45 mM pH 6,8. La subunidad C fue eluída aplicando 50 ml de un gradiente lineal de buffer fosfato de sodio 45-500 mM; las fracciones conteniendo actividad de quinasa fueron reunidas, concentradas aproximadamente hasta 500 μ l en concentradores Centricon 10 y la preparación se guardó en alícuotas de 25 μ l a -20 °C en presencia de 20 %(v/v) glicerol .

7. Estimación de los parámetros estructurales e hidrodinámicos de la PKA y de sus subunidades.

7.1. Coeficientes de sedimentación. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

Para la determinación del coeficiente de sedimentación de la PKA se utilizaron gradientes lineales de sacarosa de 5 a 20 % preparados en buffer A. Los gradientes se construyeron depositando en tubos de 5 ml sucesivas capas de 0,65 ml de soluciones de sacarosa de concentración 20; 17,5; 15; 12,5; 10; 7,5 y 5 % respectivamente, se dejaron 1 hora a temperatura ambiente, y al cabo de ese tiempo se colocaron en un baño de hielo. Inmediatamente se sembraron 0,2 ml de la mezcla que contenía la holoenzima y las proteínas marcadoras. La centrifugación se llevó a cabo a 36000 rpm durante 18 horas en un rotor SW 55 Ti. Al terminar la corrida se recolectaron fracciones de 0,2 ml haciendo sifón desde el fondo del tubo y se midió actividad de PKA y capacidad ligante de AMPc en alícuotas de cada fracción según se describe en las secciones 8.1 y 8.2..

Para la determinación de los coeficientes de sedimentación de las subunidades de la PKA el procedimiento fue similar al descrito con la excepción que los gradientes de sacarosa se prepararon en buffer A conteniendo AMPc [3 H] 0,5 μ M y la holoenzima fue preincubada durante 10 min a 30 °C en el mismo buffer conteniendo AMPc 5 μ M. En este caso la medición de la capacidad ligante de AMPc en las fracciones se realizó directamente por filtrado en nitrocelulosa de una alícuota de 40 μ l de cada fracción y se cuantificó la radioactividad retenida.

Los gradientes de sacarosa utilizados en el estudio del efecto de la polilisina sobre la activación de la PKA (sección R-2.3) se prepararon en forma similar con las adiciones indicadas en la leyenda de la figura R-14.

Los marcadores de sedimentación utilizados fueron: catalasa (11,3), glucosa oxidasa (8,3 S), peroxidasa (3,5 S) y citocromo C (1,7 S).

Los coeficientes de sedimentación de la PKA y sus subunidades se determinaron de acuerdo a Martin y Ames, (1964).

7.2. Radio de Stokes. Tamiz molecular.

La determinación del radio de Stokes para la holoenzima se llevó a cabo por filtración molecular de una preparación de holoenzima parcialmente purificada en una columna de Sephacryl S300 (1,2 x 80 cm) equilibrada con buffer A conteniendo ClNa 250 mM. La columna se desarrolló con la misma solución de equilibrio a un flujo de 4,5 ml/hora. Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna y se midió actividad de PKA y capacidad ligante de AMPc en alícuotas de todas las fracciones.

La determinación de los radios de Stokes para las subunidades de la PKA se llevó a cabo por filtración molecular de una preparación de holoenzima preincubada con AMPc [^3H] 5 μM en una columna de Sephacryl S300 (1,2 x 80 cm) equilibrada con buffer A conteniendo ClNa 150 mM y AMPc 0,5 μM . La columna se desarrolló con la misma solución de equilibrio a un flujo de 4,5 ml/hora. La medición de la capacidad ligante de AMPc se realizó según el ensayo descrito en M-8.2. excepto que la concentración de AMPc [^3H] utilizada fue de 5 μM .

El volumen de exclusión se determinó con Azul de Dextrano. Las proteínas marcadoras utilizadas fueron β -galactosidasa (6,8 nm), catalasa (5,2 nm), peroxidasa (3,0 nm) y citocromo C (1,8 nm).

Los radios de Stokes de la PKA y de sus subunidades fueron estimados gráficamente según el método de Laurent y Killander, (1964) a partir de sus volúmenes de elución y los de las proteínas marcadoras.

7.3. Estimación del peso molecular de la PKA y sus subunidades.

La estimación del peso molecular de la PKA y sus subunidades se calculó de acuerdo al método de Siegel y Monty, (1966). Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$PM = \frac{6 \pi N \eta_{20,w}}{(1 - v) \rho_{20,w}} a S_{20,w}$$

Donde N es el número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$), η es la viscosidad del agua a 20°C ($1,1 \times 10^{-2}$ g/cm seg), v es el volumen específico parcial (0,74 cm³/g), ρ es la densidad del agua a 20°C (0,98 g/cm³), a es el radio de Stokes ($\times 10^{-7}$ cm) y S es el coeficiente de sedimentación ($\times 10^{-13}$ seg).

7.4. Cociente friccional.

Para calcular los cocientes friccionales f/f_0 se utilizó el método de Siegel y Monty, (1966). Se aplicó la formula:

$$f/f_0 = a (4 \pi N / 3 v \rho PM)^{1/3}$$

8. Medición de las actividades de la PKA.

8.1. Medición de actividad de PKA.

La medición de la actividad fosfotransferasa se llevó a cabo en un volumen final de 60 μ l de una mezcla conteniendo buffer Tris HCl 20 mM pH 7,5; Cl₂Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 1 mM; ATP γ [³²P] 0,1 mM (0,1-0,5 Ci/mmol) y kémpido 0,1 mM como sustrato exógeno aceptor del grupo fosfato, en presencia o en ausencia de AMPc 50 μ M. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 min a 30 °C. La reacción se detuvo sembrando 50 μ l de la mezcla de incubación en papeles de fosfocelulosa de 2 x 2 cm los

cuales se lavaron por inmersión en solución de ácido fosfórico 75 mM tres veces consecutivas, agitando suavemente durante 10 min cada vez y una última vez con etanol 96 %. Los papeles se secaron con corriente de aire caliente y la radioactividad de los mismos se determinó usando una solución centelladora de tolueno. En todos los casos las mediciones se realizaron en condiciones de linealidad con el tiempo y con la concentración de enzima.

8.2. Medición de capacidad ligante de AMPc.

La capacidad ligante de AMPc se midió por el método de filtración en membranas de nitrocelulosa. Las mezclas de incubación conteniendo buffer Tris HCl 14 mM pH 7,5; Cl_2Mg 7 mM; β -mercaptoetanol 1,4 mM; ClNa 600 mM y AMPc [^3H] 210 nM (250000 cpm) y la preparación enzimática, en un volumen final de 60 μl , se incubaron durante 20 min a 30 °C. Alícuotas de 50 μl de las mezclas de reacción se filtraron al vacío por membranas de nitrocelulosa. Las membranas se lavaron con 10 ml de buffer TrisHCl 20 mM pH 7,4, se secaron en estufa y la radioactividad retenida en las mismas se midió en solución centelladora de tolueno. La unión no específica se determinó en presencia de 100 μM AMPc.

8.3. Ensayo de autofosforilación.

Los ensayos de fosforilación endógena se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μl de una mezcla de reacción conteniendo Tris HCl 20 mM pH 7,5; Cl_2Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 1 mM y $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ 10 μM 0.2 Ci/mmol, en ausencia de AMPc y de sustrato exógeno. La mezcla de reacción fue incubada durante 2 min a 4 °C y la reacción fue frenada por agregado de solución de Laemmli 2 x y posterior calentamiento a 100 °C durante 2 min. Cuando la fosforilación fue seguida por inmunoprecipitación la reacción fue frenada por dilución en buffer B. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE 12 %, el gel fue secado y autorradiografiado.

8.4. Marcación por fotoafinidad de la subunidad regulatoria.

La marcación con 8-azido-AMPc [^{32}P] de extractos crudos o de holoenzima parcialmente purificada se llevó a cabo según lo descrito por Walter y col., (1977). La mezcla de reacción (50 μl) contenía buffer MES 25 mM pH 6,2; EDTA 0,5 mM; EGTA 0,5 mM; inhibidores de proteasas; 8-azido-AMPc [^{32}P] 2 μM (150 Ci/mmol) y distintas cantidades de proteína. La mezcla fue incubada durante 10 min a 4 °C, irradiada con luz ultravioleta utilizando una lámpara Mineralight (254 nm) durante 12 min a 4 °C a una distancia de 3 cm (160 mW/cm²). La reacción se frenó por el agregado de solución de Laemmli 2 x y posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. Cuando la marcación fue seguida por inmunoprecipitación la reacción se frenó por dilución en buffer B. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE 12 %, el gel fue secado y autorradiografiado.

9. Medición de actividad de CK2.

La actividad de CK2 fue ensayada midiendo la incorporación de ^{32}P en caseína desfosforilada o en el péptido sintético RRRADDSDDDDD. La mezcla de incubación contenía: buffer Tris HCl 50 mM pH 7,4; β -mercaptoetanol 2 mM; Cl_2Mg_2 10 mM; ClNa 100 mM; ATP γ [^{32}P] 50 μM 20 Ci/mmol y caseína desfosforilada 5 mg/ml o péptido sintético 70 μM , en un volumen final de 50 μl . Las incubaciones fueron realizadas durante 10 min 30 °C. La reacción fue iniciada por el agregado de la fracción enzimática y terminada por el sembrado de 20 μl de la misma en papel de fosfoelulosa de 2 x 2 cm, los papeles se procesaron como en la medición de actividad de PKA.

10. Fosforilación de la subunidad R purificada.

10.1. Fosforilación por la subunidad C de la PKA.

Los ensayos de fosforilación de la subunidad R por C se llevaron a cabo en un volumen final de 30 μl de una mezcla de reacción que conteniendo buffer Tris HCl 20

mM pH 7,5; Cl_2Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 1 mM; EGTA 1 mM; EDTA 1mM; $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ 0,1 mM (1-5 Ci/mmol); inhibidores de fosfatasas y subunidad R purificada (0.1-0,5 μg). la mezcla fue incubada durante 30 min a 30 °C. La reacción fue iniciada por el agregado de la fracción enzimática y terminada por la adición de solución de Laemmli 4x y posterior calentamiento a 100 °C. durante 2 min. Las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE, el gel secado y sometido autorradiografía.

10.2. Fosforilación por CK2.

Los ensayos de fosforilación de la subunidad R por CK2 se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μl de una mezcla de reacción que conteniendo buffer Tris HCl 50 mM pH 8,5; Cl_2Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 2 mM; EGTA 1 mM; EDTA 1mM; $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ 0,1 mM (1-5 Ci/mmol); inhibidores de fosfatasas y subunidad R purificada (0.1-0,5 μg). la mezcla fue incubada durante 60 min a 37 °C. La reacción fue iniciada por el agregado de la fracción enzimática y terminada y analizada como se describió en ítem 10.1.

11. Fosforilación *in vivo* durante la morfogénesis.

Células crecidas hasta fase estacionaria en medio de Soll y Bedell fueron lavadas dos veces en agua destilada y resuspendidas en medio MIG sin fosfato a una concentración de 6×10^7 células por ml. La germinación se indujo por agregado de NAcGlc 2,5 mM y los cultivos fueron incubados a 37 °C con agitación durante 90 min en presencia de 4 mCi $[^{32}\text{P}]$ ortofosfato disódico.

Alícuotas de las células fueron centrifugadas a distintos tiempos y los extractos crudos fueron preparados por vortexeo de las células en presencia de perlas de vidrio en buffer Tris HCl 50 mM pH 8 conteniendo Tween 20 0,1 %,; ClNa 150 mM; EDTA 5 mM; inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas y centrifugación a 10000 x g durante 5 min. Los extractos crudos fueron inmunoprecipitados con antisuero anti R de *C. albicans* siguiendo el protocolo detallado en la sección M-14.3.

12. Determinación del aminoácido fosforilado.

La subunidad R fue fosforilada *in vitro* o *in vivo* según los procedimientos descritos. Una vez finalizada la reacción de inmunoprecipitación o de fosforilación *in vitro* las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE 10% y las proteínas fueron transferidas a membranas de Immobilon la cual fue autorradiografiada. La banda fosforilada fue recortada de la membrana y tratada con 200 µl de HCl 6 N durante 2 horas a 110 °C en tubo cerrado con la finalidad de hidrolizar la proteína. Luego de este tratamiento la membrana fue retirada y la muestra fue evaporada aplicando vacío y se realizaron 3 lavados con agua destilada por sucesiva resuspensión y evaporación. Finalmente la muestra fue resuspendida en 30 µl de agua destilada. Una alícuota de 5 µl (aproximadamente 3000 cpm) fue sembrada en placa delgada de microcelulosa juntamente con 2 µl de una mezcla de fosfoaminoácidos estándares y sometida a electroforesis durante 150 min en una solución pH 3,5 conteniendo: ácido acético 5% (v/v), piridina 0,5 % (v/v) a 300 V. Luego de secar la placa la ubicación de los fosfoaminoácidos estándares se determinó por tinción con ninhidrina y la de los aminoácidos marcados con [³²P] por autorradiografía.

13. Mapeo peptídico.

13.1. Mapeo por proteólisis enzimática limitada.

La subunidad regulatoria previamente fosforilada *in vitro* por C o CK2 fue incubada en presencia de proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (enzima:sustrato, 1:5) durante 15 min a temperatura ambiente o en presencia de tripsina (enzima:sustrato, 1:200) durante 15 min a 0 °C. En el caso de la fosforilación por CK2 el ensayo fue detenido por el agregado de EDTA 100 mM previo a la incubación con V8, esto fue necesario debido a que se observó que la CK2 fosforilaba a una proteína de la preparación de la proteasa y este hecho interfería en análisis de los resultados. La reacción de proteólisis fue finalizada por la adición de solución de Laemmli 4x y posterior calentamiento 100 °C

durante 2 min.. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE (12% o 15%) y el gel se autorradiografió.

13.2. Mapeo por proteólisis química.

La subunidad R fosforilada *in vitro* o *in vivo* fue sometida a SDS-PAGE 10 % y transferida a membranas de nitrocelulosa por transferencia semi seca. La membrana fue expuesta a autorradiografía y la banda fosforilada fue cortada y sometida a los siguientes tratamientos alternativos:

- 1) Clivaje en metionina: se incuba la membrana con BrCN 1mg/ml en ácido fórmico 70%
- 2) Clivaje en metionina y triptofano: se incuba la membrana con BrCN 1mg/ml, IK 12 mM en ácido fórmico 70 %.
- 3)Control : se incuba en 70 % ácido fórmico

La incubación se realiza durante 18 horas a temperatura ambiente en tubo cerrado evitando la exposición a luz en un volumen final de 200 µl. Todo el procedimiento debe llevarse a cabo bajo campana evitando la exposición al BrCN que es mortal.

Finalizada la incubación se retira la membrana y la muestra es concentrada y lavada 3 veces con 200 µl de agua destilada por centrifugación en Speed Vac. Luego se agrega a las muestras concentrada el volumen adecuado de buffer Laemmli 4x y se someten a SDS-PAGE 15% y autorradiografía del gel.

14. Técnicas inmunológicas.

14.1. Preparación de anticuerpos policlonales contra la subunidad R de *C. albicans*.

La subunidad R purificada (100 µg) se corrió en SDS-PAGE 12 % y luego de la electroforesis la proteína fue visualizada por tinción con Coomassie por el procedimiento descrito por Harlow y Lane, (1988). La región del gel conteniendo la banda de 64 kDa fue cortada y la proteína inmovilizada en acrilamida fue emulsionada con adyuvante completo de Freund para la primer inyección e incompleto para las dos posteriores,

siguiendo básicamente el protocolo descrito por Dunbar, (1987). El esquema de inmunización consistió en una primera inyección intramuscular (100 ug de proteína) y dos inyecciones subcutáneas posteriores (50 ug de proteína) a intervalos de 15 días cada una. Transcurridos 7 días de la última inyección los conejos fueron sangrados por la vena marginal de la oreja y el suero titulado por Western blot. El suero preinmune fue preparado a partir de la sangre de los mismos conejos extraída antes de la inmunización.

14.2. Técnica de Western-blot.

La técnica utilizada para la detección inmunológica de las proteínas de interés sobre membranas de nitrocelulosa o PVDF se realizó según el protocolo que se detalla a continuación.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa (0,45 µm Protran™, Schleicher & Schuell) o PVDF (Immobilon-P SQ, Millipore) por transferencia semi seca con una solución conteniendo Tris base 48 mM; glicina 39 mM; SDS 0,037 % y metanol 20 % durante 45 min a 2 mA/cm². Las proteínas transferidas fueron visualizadas por tinción con colorante de Ponceau S 0,1 % en ácido acético 5 % durante 5 min; el colorante se eliminó con agua destilada.

Las membranas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en PBST-leche (Buffer fosfato 10 mM pH 6,8, ClNa 0.9 %, Tween 20 0,05 % y leche en polvo descremada 5%).

A continuación se incuban las membranas en presencia del anticuerpo primario diluido en PBST-leche durante 2 horas a temperatura ambiente para el anticuerpo anti R de *C. albicans* o durante toda la noche a 10 °C para los anticuerpos heterólogos. Los anticuerpos heterólogos utilizados fueron: anticuerpos policlonales anti R y anti C de *B. emersonii* y un anticuerpo policlonal anti C de *D. discoideum*.

Finalizada la incubación las membranas fueron lavadas 4 veces durante 10 min cada vez con PBST, luego fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente, diluido 1:4000 en el mismo buffer durante 2 horas a temperatura ambiente. En el caso de los anticuerpos primarios anti R y C de *B. emersonii* el

anticuerpo secundario utilizado fue anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa, para el anticuerpo anti C de *D. discoideum* se utilizó anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa.

Al término de la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 min cada vez con PBST y un último lavado de 10 min con PBS.

Los inmunocomplejos fueron revelados utilizando el sistema de revelado de quimioluminiscencia siguiendo las indicaciones del fabricante (Dupont-NEN) o alternativamente utilizando como sustrato cromogénico 4-cloro-1 α -naftol; en este caso la solución de revelado se prepara con 27 mg de 4-cloro-1 α -naftol en 5,7 ml de metanol frío mezclados inmediatamente antes de usar con 28 ml de PBS con el agregado de 71 μ l de H₂O₂ 100 %.

14.3. Inmunoprecipitación.

Se utilizó el protocolo de inmunoprecipitación descripto por Harlow y Lane, (1988) con algunas modificaciones. Proteínas de extractos crudos o holoenzima parcialmente purificada fueron incubadas con las diluciones indicadas del antisero anti R de *C. albicans* en buffer Tris HCl 50 mM, pH 8 conteniendo Tween 20 0,1 %; ClNa 150 mM; EDTA 5 mM; inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas (buffer B) durante 1 hora a 4 °C. Luego de la incubación se agregaron 20 μ g de proteína A Sepharose preparada en el mismo buffer, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación y finalmente las muestras fueron centrifugadas durante 2 min a 10000 x g. El sobrenadante fue recuperado y el precipitado fue lavado 3 veces por sucesivas centrifugaciones a 10000 x g 2 min y resuspensiones en buffer B. Alícuotas del sobrenadante y del precipitado resuspendido en buffer B fueron ensayadas para actividad de PKA y actividad ligante de AMPc.

Se realizaron los controles con suero preinmune para establecer la especificidad de la inmunoprecipitación.

14.4. Inmunofluorescencia.

Levaduras crecidas hasta fase estacionaria (10^7 células) fueron lavadas dos veces con buffer Tris HCl 10 mM pH 7,5 e incubadas en el mismo buffer con glucagon 25 μ M durante 1 hora a 0 °C en un volumen final de 50 μ l; luego las células fueron lavadas una vez con 1 ml del mismo buffer e incubadas en 50 μ l de suero antiglucagon 1:20 (o suero preimmune como control) durante 30 min a 0 °C. Finalizada la incubación el antisuero fue lavado y se agregó el fragmento F(ab') proveniente de IgG de cabra anti IgG de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína en una dilución 1:30 y se incubó 1 hora a 0 °C en un volumen final de 50 μ l. Después de dos lavados con 1 ml de buffer, las células fueron fijadas con formol 0,5 % durante una noche. Las células fueron montadas en portaobjetos en PBS-90 % glicerol, examinadas y fotografiadas en un microscopio Zeiss Axioplan. El porcentaje de células fluorescentes se evaluó en experimentos realizados por triplicado en cada uno de los cuales se cuantificaron al menos 200 células.

15. Geles de poliacrilamida con SDS.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se llevaron a cabo en minigeles siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Las muestras fueron mezcladas con un volumen adecuado de solución de Laemmli (Tris HCl 0,124 M pH 6,8; β -mercaptoetanol 10 % (v/v); glicerol 20 % (v/v); SDS 4,6 % (p/v) y Azul de bromofenol 0,01 % (p/v)) y calentadas durante 5 min a 100 °C. Cuando los geles no fueron transferidos a nitrocelulosa o inmobilon fueron teñidos para visualizar las proteínas con solución teñidora (Coomassie Brilliant Blue R250 0,1 % (p/v); metanol 20 %; ácido acético 40 %) y destañidos con la solución decolorante (metanol 20 %; ácido acético 40 %), luego fueron secados al vacío y por calor. Cuando las distintas muestras habían sido sometidas a fosforilación, la radioactividad incorporada en las proteínas fue detectada exponiendo los geles previamente secos a placas radiográficas Agfa Curix RP-1 a -70°C, utilizando pantalla amplificadora.

16. Materiales.

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Co: glucagon, kémptido, PKI (5-24); inhibidores de proteasas; teofilina; AMPc; dbAMPc; 8-azido-AMPc, ATP; GTP γ S; polilisina (grado de polimerización= 120), proteínas marcadoras, AMPc agarosa, perlas de vidrio, Proteína A Sepharose CL-AB; antisueros anti IgG de conejo y de ratón acoplados a peroxidasa. El sistema de revelado por quimioluminiscencia " Renaissance TM Western Blot Chemiluminescence Reagent System" fue provisto por Dupont-NEN.

Los nucleótidos radioactivos fueron provistos por: Dupont-NEN , el ATP γ [³²P] y el AMPc[³H] y Amersham International Ltd., el 8-azido-AMPc[³²P].

Todos los reactivos utilizados en SDS-PAGE fueron de grado electroforético provistos por BioRad, los marcadores de peso molecular fueron "Kaleidoscope prestained estándar".

El suero humano fue obtenido de donantes sanos; los suero de caballo y conejo fueron provistos por Gibco (BRL); todos los sueros fueron inactivados por calentamiento a 56 °C durante 30 min y guardados en alícuotas a -20°C.

El antisuero anti glucagon (RPN 1602) fue de Amersham International Ltd.; el antisuero anti C de *D. discoideum* fue gentilmente cedido por el Dr Michel Veron , Instituto Pasteur, Francia y los antisueros anti R y anti C de *B. emersonii* fueron gentilmente cedidos por la Dra. Suely Lopes Gomes, Instituto de Química, Universidad de San Pablo, Brasil.

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Efecto del glucagon y de los nucleótidos sobre la morfogénesis de *C. albicans*.

1.1. Inducción de la transición levadura-micelio en *C. albicans* por N-acetil-glucosamina (NAcGlc). Efecto estimulador del glucagon.

La inducción de la formación del tubo germinativo en células estacionarias de *C. albicans* por NAcGlc fue reportada por primera vez por Simonetti y col. (1974) y ha sido desde entonces ampliamente utilizada como inductor de la germinación (Mattia y Cassone, 1979; Mattia y col., 1982; Sheperd y Sullivan, 1984; Hubbard y col., 1985). Sin embargo, es bien sabido que las distintas cepas de *C. albicans* pueden diferir significativamente en su respuesta a la NAcGlc (Wain y col., 1976). Por esta razón fue necesario evaluar previamente la respuesta de nuestra cepa a la presencia de NAcGlc.

La **Tabla R-1** muestra la relación entre la concentración de NAcGlc en el medio de inducción y el porcentaje de células germinadas. Puede observarse que, por un lado la formación de tubos germinativos fue eficiente aún a bajas concentraciones del inductor y por otro, que la germinación fue totalmente dependiente de la presencia del mismo, ya que no se observó formación de tubos germinativos en ausencia de NAcGlc. La cepa de *C. albicans* en estudio puede, en consecuencia, considerarse como de alta respuesta a la presencia de NAcGlc.

Una vez determinada la respuesta de la cepa al inductor se procedió a investigar el efecto del glucagon sobre la morfogénesis inducida por NAcGlc. Como puede verse en la **figura R-1** la formación de tubos germinativos fue estimulada en forma creciente por el glucagon a lo largo de las concentraciones ensayadas. El efecto de la hormona fue evaluado en presencia de concentraciones subóptimas del inductor con el fin de hacer mas evidente el efecto estimulador. Es importante resaltar que el glucagon *per se*, es decir en ausencia del inductor, no promueve la formación de micelio a partir de células levaduriformes (resultado no mostrado).

Tabla R-1. Capacidad de los inductores de promover la germinación en *C. albicans*.
 Las incubaciones se realizaron según se detalla en el ítem M-1.3.2.

Inductor	Concentración	% tubos germinativos
-	-	0
NAcGlc	0.01 mM	0
	0.1 mM	15 ± 2
	5 mM	50 ± 4
	10 mM	80 ± 5
	20 mM	90 ± 6
	40 mM	95 ± 2
Suero	1 %	12 ± 3
	5 %	72 ± 5
	10 %	86 ± 6
	20 %	98 ± 2

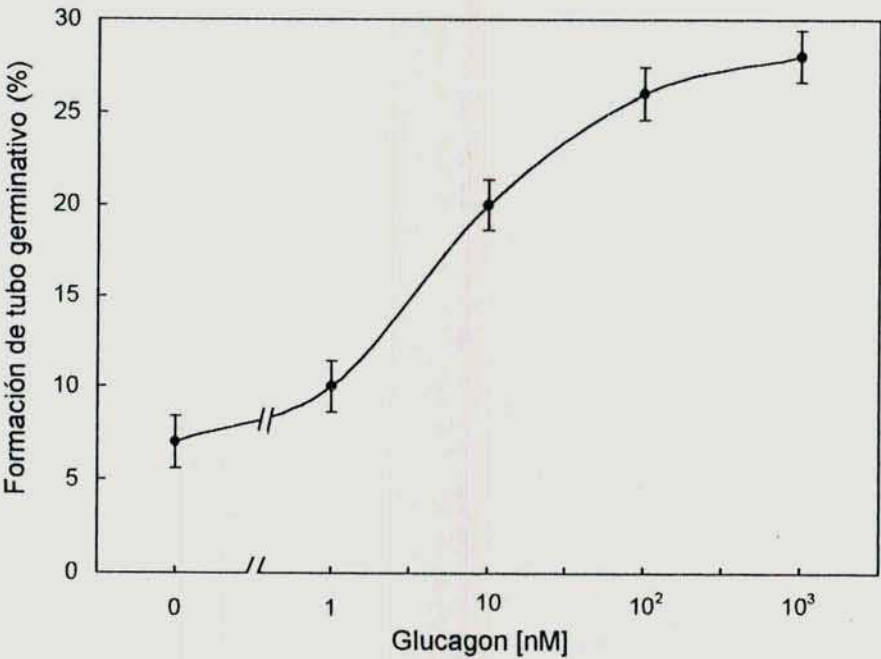


Figura R-1. Estimulación de la formación de tubos germinativos por glucagon.
 Células levaduriformes de *C. albicans* fueron inducidas a germinar en NAcGlc 0,05 mM en presencia de las concentraciones indicadas de glucagon. Las condiciones experimentales se detallan en el ítem M-1.3.2. Las barras indican el 95 % de la diferencia significativa mínima (LSD) de la media calculada a partir de determinaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo.

1.2. Efecto del antagonista específico sobre la actividad estimulatoria del glucagon.

Con el propósito de ahondar en el mecanismo de acción del glucagon sobre la transición levadura-micelio se realizaron experimentos de competencia utilizando un análogo del glucagon, el des-His¹[Glu⁹]glucagon amida. Las propiedades antagonistas del des-His¹[Glu⁹]glucagon amida han sido extensamente discutidas por Unson y col.(1987,1989), quedando demostrada la capacidad del análogo de unirse con alta afinidad al receptor del glucagon en hepatocitos sin producir la activación de la adenilil ciclasa.

En la **figura R-2** se puede ver que a una relación molar de 25:1 (análogo respecto de la hormona) la respuesta al glucagon fue reducida en un 30 % y que a una relación molar de 50:1 la inhibición alcanza el 60 %. Estos datos concuerdan con los reportados para la inhibición por el antagonista del efecto hiperglucémico del glucagon *in vivo* (Unson y col., 1989).

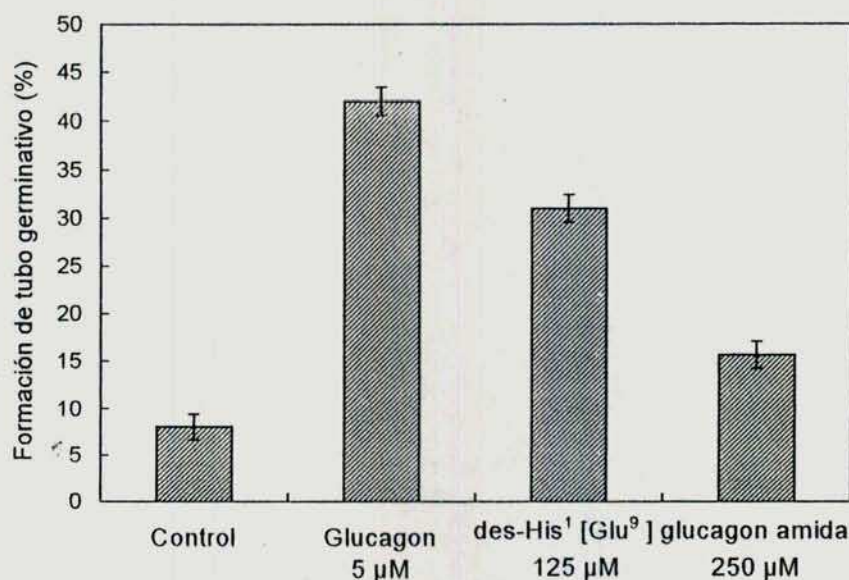


Figura R-2. Inhibición del efecto del glucagon por des-His¹[Glu⁹]glucagon amida. La formación de tubos germinativos fue ensayada en presencia de 0,05 mM NAcGlc y 5 µM glucagon en presencia o en ausencia de las concentraciones indicadas del análogo. El control muestra el valor del porcentaje de tubos germinativos en presencia de NAcGlc sola. Las condiciones experimentales se detallan en el ítem M-1.3.2. Las barras de error representan lo mismo que en la **figura R-1**.

Estos resultados demuestran la especificidad de la estimulación del proceso morfogénico por el glucagon y permiten plantear la hipótesis que la hormona podría actuar *in vivo* estimulando la adenilil ciclase a través de un mecanismo similar al reportado para eucariotas superiores. A favor de esta hipótesis cuenta el hecho que en nuestro laboratorio ya ha sido demostrada la existencia de una adenilil ciclase dependiente de Mg^{+2} y estimulable por glucagon en células permeadas de *C. albicans* (Paveto y col., 1991).

1.3. Efecto de los nucleótidos sobre la germinación.

Es bien sabido que en hepatocitos el glucagon se une a un receptor específico de membrana plasmática, y que esta interacción resulta en la activación de la adenilil ciclase con el consecuente aumento de los niveles de AMPc intracelular provocando así la activación de la PKA (Pilkis y col., 1988). Como ya se ha hecho referencia en la Introducción, se ha demostrado en nuestro laboratorio la existencia en células levaduriformes de *C. albicans* de todos los componentes necesarios para poner en juego una vía de transducción de señales mediada por AMPc similar a la de eucariotas superiores (Paveto y col., 1990, 1991). Esto nos permite suponer que el aumento de los niveles intracelulares de AMPc producido al incubar las células en presencia del nucleótido cíclico, o de compuestos capaces de elevar los niveles de AMPc dentro de la célula, debería simular el efecto del glucagon. Para ello se investigó el efecto del AMPc, del dbAMPc, de la teofilina, probado inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc de *C. albicans*, y del GTP γ S (un potente activador de la adenilil ciclase dependiente de Mg^{+2}) sobre la morfogénesis inducida por NAcGlc.

En la **figura R-3** se observa que todos los compuestos capaces de mantener elevados los niveles endógenos de AMPc, aumentaron marcadamente la formación de tubos germinativos.

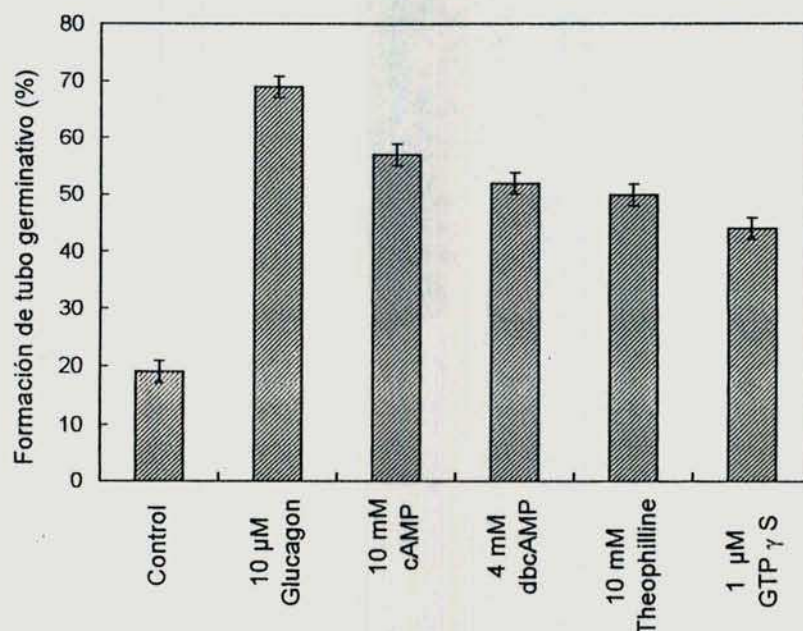


Figura R-3. Efecto de nucleótidos y teofilina en los estadios tempranos de la morfogénesis de *C. albicans*. Los experimentos de germinación se llevaron a cabo según se detalla en el ítem M-1.3.1. en presencia de NAcGlc 0,05 mM y con las adiciones indicadas. El control corresponde al valor del porcentaje de tubos germinativos formados en presencia de NAcGlc sin adiciones. La estimulación por glucagon se incluye para su comparación. El cálculo del error estándar es similar al graficado en la figura R-1.

1.4. Determinación a la formación del tubo germinativo por NAcGlc.

Pese a que en todos los experimentos de germinación se utilizan células obtenidas de cultivos en fase estacionaria, la respuesta al inductor no es sincrónica y en consecuencia resulta una población heterogénea de células que aún no han germinado y otras que han alcanzado diferentes grados de elongación de los tubos germinativos.

Con la intención de obtener una mayor sincronía del proceso, que permitiera medir no sólo el porcentaje de germinación sino también la velocidad de crecimiento de las hifas, se removió la NAcGlc del medio de inducción a los 45 min de incubación. Se observó que, inesperadamente, la remoción del inductor a los 45 min de incubación, cuando en nuestras condiciones experimentales el 20 % de las células recién habían emitido el tubo germinativo, no interrumpía el proceso; los resultados mostrados en la

tabla R-2 indican claramente que la germinación alcanzada al final del período de incubación no se ve afectada por la remoción de la NAcGlc a los 45 min. Esto indica que el compromiso del sistema para germinar parece establecido antes que se haga evidente la evaginación ya que el porcentaje de germinación alcanzado al final del período de incubación es al menos 3 veces mayor que el estimado en el momento de retirar el inductor.

Este efecto de compromiso del proceso morfogénico que produce la NAcGlc sobre las levaduras fue observado a concentraciones tan bajas como 0,05 mM, y en todos los casos el porcentaje de células germinadas al final de la incubación dependió de la concentración de inductor utilizada.

La determinación a la formación del tubo germinativo inducida por pH y por temperatura en la germinación de *C. albicans* fue previamente descrita por Mitchell y Soll, 1979.

Tabla R-2. Efecto de la remoción de los inductores sobre la formación del tubo germinativo.

Inductor	% células evaginadas antes de la remoción del inductor ^a	% formación del tubo germinativo a los 90 min de incubación ^a	
		inductor removido a los 45 min	sin remoción
NAcGlc 5 mM	16 ± 2	50 ± 4	60 ± 3
Suero 7,5 %	20 ± 3	26 ± 2	82 ± 2

^a Media ± desvío estándar de triplicados de un experimento representativo.

1.5. Desarrollo de las hifas en presencia de glucagon y nucleótidos.

En los experimentos en los cuales se analizó el efecto del glucagon y de los nucleótidos, se hizo evidente que, paralelamente al efecto estimulador sobre la germinación, el glucagon, así como los otros compuestos ensayados, tenían la propiedad de aumentar la velocidad de elongación de las hifas.

Con el fin de evaluar este último efecto, se modificó el esquema de inducción de la germinación de forma tal que la NAcGlc fue retirada del medio después de 45 min de incubación a 37 °C y en ese momento se agregaron los diferentes estimuladores (ver M-1.3.2.). Bajo estas condiciones el crecimiento de las hifas fue mucho más sincrónico permitiendo la comparación entre diferentes tratamientos. La inducción se llevó a cabo con concentraciones subóptimas de NAcGlc para permitir una correcta observación del largo de las hifas. A concentraciones mayores la medición del largo de las hifas es más dificultosa debido al alto porcentaje de células germinadas lo cual lleva rápidamente a la formación de acúmulos cuando las hifas aumentan su longitud.

La **figura R-4** muestra la morfología alcanzada por las células levaduriformes cuando son sometidas a este nuevo protocolo de formación de tubos germinativos. Como puede verse, el glucagon, el AMPc y el GTP γ S tienen una dramática influencia sobre el crecimiento de las hifas; la teofilina y el dbAMPc producen un efecto similar.

1.6. Efecto del glucagon sobre la formación del tubo germinativo inducida por suero.

Ya que nuestro objetivo es estudiar la relación entre el efecto del glucagon en la morfogénesis y su putativa influencia en la patogenia del hongo *in vivo*, se realizaron experimentos en los cuales la NAcGlc fue reemplazada por suero humano como agente inductor de la germinación.

Como en el caso de la NAcGlc, fue necesario evaluar la respuesta de *C. albicans* 1001 a las diferentes concentraciones de suero humano. Como puede verse en la **tabla R-1** el suero produjo una eficiente inducción de la transición levadura-micelio. Los sueros de caballo y de conejo produjeron el mismo efecto (resultados no mostrados).

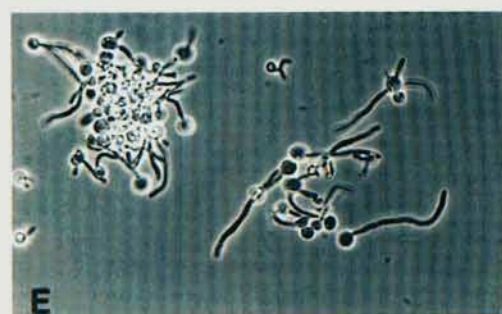
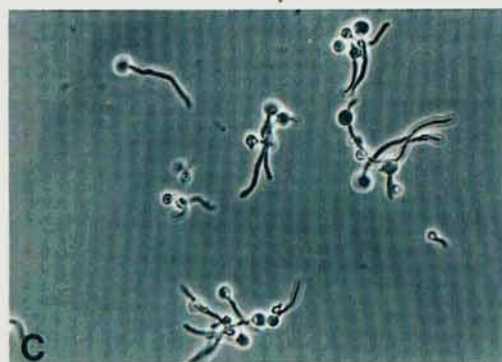
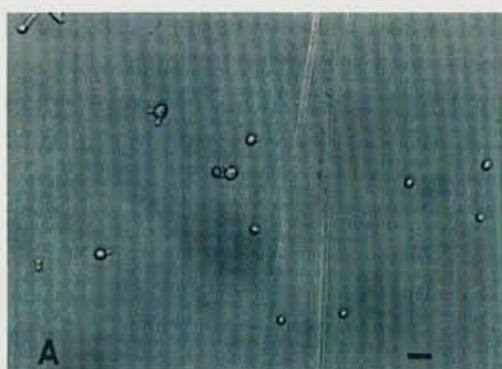


Figura R-4. Efecto del glucagon y de los nucleótidos sobre el desarrollo de la hifas.

Las incubaciones fueron llevadas a cabo según se detalla en el ítem M1.3.2. (A) células en el momento de la remoción de la NAcGlc, (B-E) células después de la incubación adicional de 45 min a 37 ° C sin inductor y con el agregado de : (B) nada, (C) 10 μ M glucagon , (D) 10 mM AMPc y (E) 1 μ M GTP γ S. Barra: 10 μ m.

Si bien la respuesta de *C. albicans* 1001 a la inducción es tan eficiente con NAcGlc como con suero, se observó una diferencia destacable en cuanto a la necesidad de la presencia constante del inductor a lo largo de la incubación. Como se puede observar en la **tabla R-2**, segunda línea, sólo aquellas células que ya habían evaginado en presencia de suero desarrollaron tubos germinativos normales después de la remoción del suero; se requirió la presencia continua del suero para lograr mayor germinación. La importancia de este resultado en el marco del mecanismo bioquímico de la transición dimórfica se discutirá más adelante.

La respuesta de *C. albicans* al efecto estimulador del glucagon en presencia de suero fue sensiblemente diferente al obtenido con NAcGlc; en la **figura R-5** se comparan los porcentajes de germinación obtenidos con distintas concentraciones de glucagon en presencia de suero humano 2% o de NAcGlc 0,1 mM, en experimentos realizados en paralelo utilizando células obtenidas a partir del mismo cultivo.

A pesar de que las curvas obtenidas en diferentes experimentos fueron levemente variables, dos hechos principales se repitieron sistemáticamente y merecen ser destacados: por un lado, en presencia de suero la capacidad estimuladora del glucagon se vio notablemente aumentada, siendo el máximo efecto unas 2,5 veces mayor que el obtenido con NAcGlc. Por otro lado, una concentración de glucagon de 0,1 nM fue suficiente para alcanzar la mitad de la actividad estimuladora máxima, mientras que para la NAcGlc se requirieron concentraciones entre 5 y 10 nM. La adición de albúmina 1mg/ml a las incubaciones realizadas con NAcGlc no modificaron los resultados. Los mismos resultados fueron obtenidos con suero de caballo y de conejo (no mostrados).

En los experimentos en que el suero fue utilizado como inductor se observó una mayor tendencia a la formación de acúmulos de células una vez que las hifas habían alcanzado una longitud de casi el doble del diámetro de las blastosporas; este inconveniente impidió el estudio del efecto del suero sobre la velocidad de elongación del micelio.

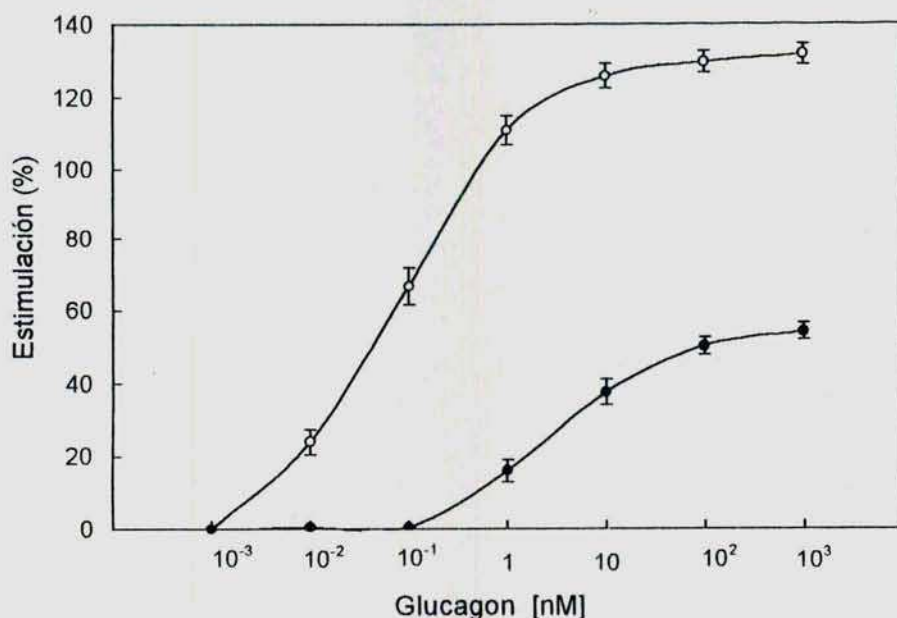


Figura R-5. Efecto del glucagon sobre la evaginación del tubo germinativo en blastosporas inducidas a germinar en presencia de suero humano (○) o NAcGlc (●). Las condiciones experimentales se detallan en la sección M-1.3.2.. El porcentaje de germinación basal con suero humano 2 % y NAcGlc 0,1 mM fueron de 18 % y 15 % respectivamente. Las barras indican el error estándar de las medias de determinaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo.

1.7. Efecto del anticuerpo anti glucagon sobre la actividad estimuladora del glucagon.

Con la intención de evaluar la especificidad del efecto estimulador del glucagon sobre la morfogénesis, se estudió la capacidad de dos anticuerpos anti-glucagon (uno policlonal y otro monoclonal) de bloquear dicho efecto.

Ambos anticuerpos fueron capaces de bloquear la actividad del glucagon. En la **figura R-6** se muestran los resultados obtenidos usando el anticuerpo monoclonal. Como puede verse, la preincubación del glucagon con una dilución 1:1000 del anticuerpo suprimió totalmente su capacidad estimulante de la germinación. Se realizaron experimentos controles en los cuales se comprobó que ninguno de los dos anticuerpos tenía efecto *per se* sobre la germinación en ausencia del glucagon.

Estos resultados indican fuertemente que el efecto observado puede adjudicarse específicamente al glucagon y no a algún otro compuesto que pudiera estar presente en la preparación de la hormona utilizada.

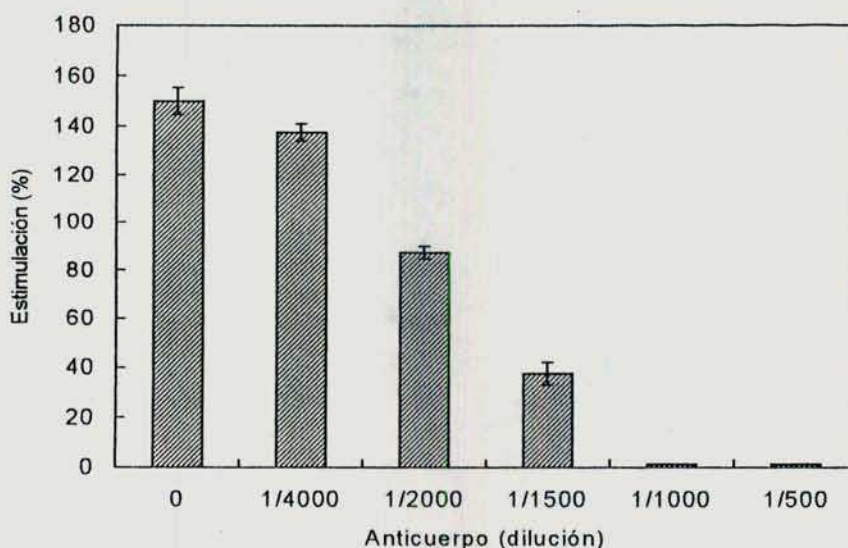


Figura R-6. Efecto bloqueante del anticuerpo monoclonal antiglucagon sobre la formación de tubos germinativos inducida por suero. Glucagon en una concentración de 100 nM fue preincubado en ausencia o en presencia de las diluciones del anticuerpo indicadas, antes del agregado de las células al medio de germinación (ver ítem M1.3.2.).

1.8. Detección por inmunofluorescencia de sitios de unión de glucagon a blastosporas de *C. albicans*.

Un requisito indispensable para postular la existencia de fenómenos disparados por un agente externo a la célula es demostrar la unión de dicho agente a la célula blanco; en nuestro caso se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar la unión del glucagon a células de *C. albicans*. Los detalles de la técnica se encuentran explicados en la sección M-14.4.

En la **figura R-7** se muestran microfotografías en contraste de fase y fluorescencia, de blastosporas marcadas con un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína luego de haber sido incubadas en presencia de glucagon y del anticuerpo primario anti-glucagon. Se observa que las células fluorescentes pueden ser distinguidas claramente de aquellas que son consideradas como negativas.

En la **tabla R-3** se resumen los datos obtenidos a partir de un experimento representativo en el cual se cuantificó el porcentaje de células marcadas en las distintas condiciones señaladas; se puede ver que un alto porcentaje de las células se marca con fluorescencia cuando han sido previamente incubadas con glucagon, mientras que en

ausencia de la hormona el porcentaje de células fluorescentes se ve marcadamente disminuido. La detección de fluorescencia en las células fue claramente dependiente de la interacción del anticuerpo específico anti-glucagon con las células tratadas con la hormona, ya que la fluorescencia prácticamente desapareció en ausencia del anticuerpo primario (ver líneas 3 y 6 de la **tabla R-3**). El suero preinmune, usado como control , no mostró un aumento significativo del porcentaje de células fluorescentes.

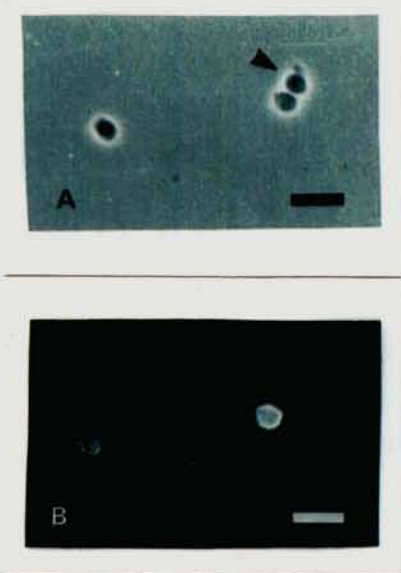


Figura R-7. Inmunofluorescencia indirecta en blastosporas de *C. albicans* tratadas con glucagon y anticuerpo antiglucagon. Se muestran las fotografías en (A) contraste de fase y (B) fluorescencia de levaduras de *C. albicans* tratadas con la hormona y su anticuerpo específico según se detalla en las secciones M-1.3.2. y M-9.4.. La flecha indica la localización de una célula que no exhibe fluorescencia bajo luz ultravioleta. Barra: 10 μm.

Tabla R-3. Detección por inmunofluorescencia de sitios de unión de glucagon en blastosporas de *C. albicans*.

Tratamiento de las células	Glucagon	Anticuerpo anti-glucagon	Suero preinmune	Antisuero anti-IgG de conejo	% de células fluorescentes ^a
1	+	+	-	+	93 ± 4
2	-	+	-	+	30 ± 3
3	+	-	+	+	7 ± 1
4	-	-	+	+	8 ± 2
5	+	-	-	+	0
6	-	-	-	+	0

^a Media ± desvío estándar de triplicados de un experimento representativo.

1.9. Integración.

Los resultados reunidos en esta primera sección, demuestran claramente que el glucagon estimula la transición dimórfica de *C. albicans* cuando la misma ha sido previamente inducida por NAcGlc o por suero.

La capacidad del antagonista específico des-His¹[Glu⁹] glucagon amida de bloquear en un 70 % el efecto de la hormona sugiere que la estimulación de la germinación podría involucrar la interacción del glucagon con alguna proteína de la superficie celular que cumpliera el rol de receptor. Esta hipótesis es fuertemente apoyada por los experimentos de inmunofluorescencia indirecta, en los cuales la unión previa de la hormona fue necesaria para la visualización de células marcadas con fluoresceína.

Es bien sabido que el glucagon ejerce su efecto fisiológico a través del AMPc producido por activación de la adenilil ciclase de membrana en respuesta a la interacción de la hormona con su receptor; por otro lado se sabe también que el análogo del glucagon des-His¹[Glu⁹] glucagon amida, se une fuertemente al receptor de glucagon pero es incapaz de activar a la ciclase actuando en consecuencia como antagonista de la hormona (Unson y col., 1987, Posty col., 1993). La respuesta de *C. albicans* frente al glucagon y a su antagonista, y el conocimiento previo de la existencia en *C. albicans* de una adenilil ciclase sensible a glucagon y de proteínas de tipo G triméricas permiten proponer que el mecanismo por el cual el glucagon está actuando en la estimulación de la diferenciación en *C. albicans* podría involucrar una cadena de transducción de señales similar a la descrita para esta hormona en eucariotas superiores.

Si la hipótesis planteada en el párrafo anterior es valedera, es razonable inferir que el agregado exógeno del nucleótido cíclico debería producir la misma respuesta que el glucagon. De hecho, la presencia de AMPc, de dbAMPc, y de compuestos que generan un aumento del AMPc intracelular como la teofilina, aumentaron la formación de tubos germinativos en células inducidas por NAcGlc. El efecto estimulador del GTPγS si bien ya había sido informado en otra cepa de *C. albicans* (Williams y col., 1990), no es fácilmente explicable en términos de activación directa de proteínas G ya que no es de esperar que sea fácilmente permeable y pueda alcanzar el interior de la

célula; sin embargo otros nucleótidos como ATP y ADP no tuvieron ningún efecto lo que indica que tampoco se trata de un efecto totalmente inespecífico.

Paralelamente hemos demostrado que el glucagon, los nucleótidos y la teofilina tienen un marcado efecto en la velocidad de elongación de las hifas, llegándose a observar un aumento de la velocidad de elongación de 2 a 3 veces, en presencia de los estimuladores.

Intentando un abordaje más fisiológico, se estudió el efecto del glucagon en células inducidas a germinar por suero en lugar de NAcGlc. Sorpresivamente la respuesta de las células al glucagon fue mucho más pronunciada en presencia de 2% de suero humano normal. Como la concentración normal de glucagon en suero de humanos sanos es de aproximadamente 0,02 nM, la concentración de la hormona aportada por el suero es despreciable. Por lo tanto, tomando en cuenta sólo la concentración del glucagon agregado exógenamente, los datos de la **figura R-5** muestran que una concentración de 0,1 nM de glucagon es suficiente para alcanzar el 50 % de la germinación máxima en cultivos inducidos con suero, es decir casi dos órdenes de magnitud menos que la necesaria cuando se utiliza NAcGlc como inductor. Mas aún, los cultivos inducidos por suero alcanzan porcentajes de estimulación unas 2,5 veces mayores que los logrados con NAcGlc (130 % contra 50 %). Este resultado sugiere la presencia de un componente no identificado del suero que podría potenciar la acción del glucagon.

La capacidad de dos anticuerpos anti-glucagon diferentes de bloquear el efecto estimulatorio del glucagon nos permite concluir que es efectivamente la presencia de la hormona la que promueve el efecto observado.

El efecto del glucagon sobre la morfogénesis inducida por suero merece ser comentado en particular. Los resultados presentados en esta sección demuestran que en presencia de suero concentraciones muy bajas de glucagon pueden tener un efecto dramático en la transición levadura micelio. Por otro lado se sabe que uno de los desórdenes metabólicos especialmente asociados a la candidiasis severa es la diabetes mellitus (Odds, 1988) y que los pacientes que sufren esta enfermedad presentan niveles de glucagon considerablemente superiores a los normales (Genrich y col., 1975; Unger y

Orci, 1975; Unger y col., 1976). Con estos antecedentes nuestros resultados sugieren que *in vivo*, niveles de glucagon ligeramente superiores a los normales podrían tener una influencia importante en la transición dimórfica de *C. albicans*, promoviendo la aparición de la forma más infecciosa del hongo.

Si bien estos resultados no agotan una descripción completa del mecanismo que involucra la transición dimórfica, proveen evidencias del importante rol del AMPc en el dimorfismo de *C. albicans* y refuerza la idea que la vía del AMPc podría ser disparada por hormonas del huésped interactuando con componentes de la superficie celular que podrían cumplir un rol semejante al de los receptores hormonales en células de organismos superiores.

2. Caracterización y purificación parcial de la PKA de *C. albicans*.

2.1. Purificación parcial de la holoenzima.

La metodología utilizada para la purificación parcial de la holoenzima se detalla en Materiales y Métodos en el ítem M-4. El primer paso del protocolo de purificación consistió en la cromatografía del extracto soluble (S100) de levaduras en una columna de intercambio aniónico (DE-52). La holoenzima eluye de esta columna como un único pico a 150 mM ClNa, con actividad de quinasa absolutamente dependiente de AMPc y actividad ligante de AMPc (resultados no mostrados). Cuando extractos crudos de micelio fueron cromatografiados en DE-52 el perfil de elución obtenido fue similar.

El análisis de la fracción eluida de la DE-52 en gradientes de sacarosa, mostró que la actividad de quinasa dependiente de AMPc coelúa con una apreciable cantidad de subunidad regulatoria libre, por esta razón fue necesario someter la preparación a filtración molecular (Sephacryl S300) con el fin de separar ambas especies. Alternativamente la fracción de holoenzima libre de subunidad regulatoria se obtuvo por centrifugación en gradientes de sacarosa. La caracterización estructural y cinética se realizó con la preparación de holoenzima purificada hasta el paso de filtración en Sephacryl S300.

2.2. Caracterización de la holoenzima.

Se realizó la caracterización de la PKA de *C. albicans* respecto del tamaño molecular de la holoenzima y de la composición y tamaño molecular de sus subunidades, parámetros cinéticos y efecto de plicationes sobre la activación de la holoenzima.

2.2.1. Cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la PKA y de sus subunidades.

Para el cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la PKA de *C. albicans* y de sus subunidades regulatoria y catalítica, se utilizaron los datos de los coeficientes de sedimentación y radios de Stokes, obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración molecular respectivamente.

2.2.1.1. Determinación de los coeficientes de sedimentación.

Las centrifugaciones en gradientes de sacarosa se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento general descrito en la sección M-7.1. En la **figura R-8.A** se muestra el perfil de actividad fosforilante y capacidad ligante de AMPc obtenido al centrifugar en gradientes de sacarosa una preparación de holoenzima parcialmente purificada. Se puede observar que la actividad de quinasas y de unión de AMPc cosedimentaron en un único pico cuyo coeficiente de sedimentación fue estimado en 8,2 S (ver **figura R-8.C**).

Para la obtención de los coeficientes de sedimentación de las subunidades regulatoria y catalítica una alícuota apropiada de la holoenzima parcialmente purificada fue preincubada con 5 μM AMPc[^3H] durante 5 min a 30 °C, y el gradiente de sacarosa fue armado incluyendo en cada capa 0,5 μM AMPc[^3H] para evitar la reasociación de las subunidades durante la corrida.

La actividad ligante de AMPc y la actividad fosforilante se comportaron como dos entidades independientes con coeficientes de sedimentación menores que los de la holoenzima. Este resultado indica que la incubación previa con AMPc produjo la

disociación de la holoenzima en sus componentes regulatorio y catalítico los cuales sedimentaron en el gradiente como dos picos simétricos con coeficientes de sedimentación de 5 y 5,3 S respectivamente (**figura R-8.B**).

2.2.1.2. Determinación de los radios de Stokes.

Para determinar los radios de Stokes de la holoenzima y de sus subunidades se utilizó la filtración molecular en Sephacryl S300 como se indicó en la sección M-7.2. Para analizar las subunidades se preincubó la holoenzima en condiciones disociantes y la columna fue equilibrada con buffer A conteniendo 0,5 μ M AMPc.

En la **figura R-8.D**, se puede ver la relación entre $(-\log(K_{av}))^{1/2}$ y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras y las posiciones correspondientes a la holoenzima y sus subunidades regulatoria y catalítica; por interpolación se obtuvieron los siguientes radios de Stokes: holoenzima 7,4 nm, subunidad regulatoria 5,4 nm y subunidad catalítica 3,1 nm.

2.2.1.3. Determinación de la masa molecular.

Una vez conocidos los coeficientes de sedimentación y el radio de Stokes de la quinasa y sus subunidades y suponiendo un volumen específico parcial semejante al de las proteínas globulares solubles (0,74 ml/g), se estimaron los pesos moleculares utilizando la ecuación planteada en la sección M-7.3. de Materiales y Métodos. Las masas moleculares calculadas fueron: holoenzima 287 kDa, subunidad regulatoria 128 kDa y subunidad catalítica 78 kDa. La masa molecular de la subunidad R corresponde a la estructura dimérica.

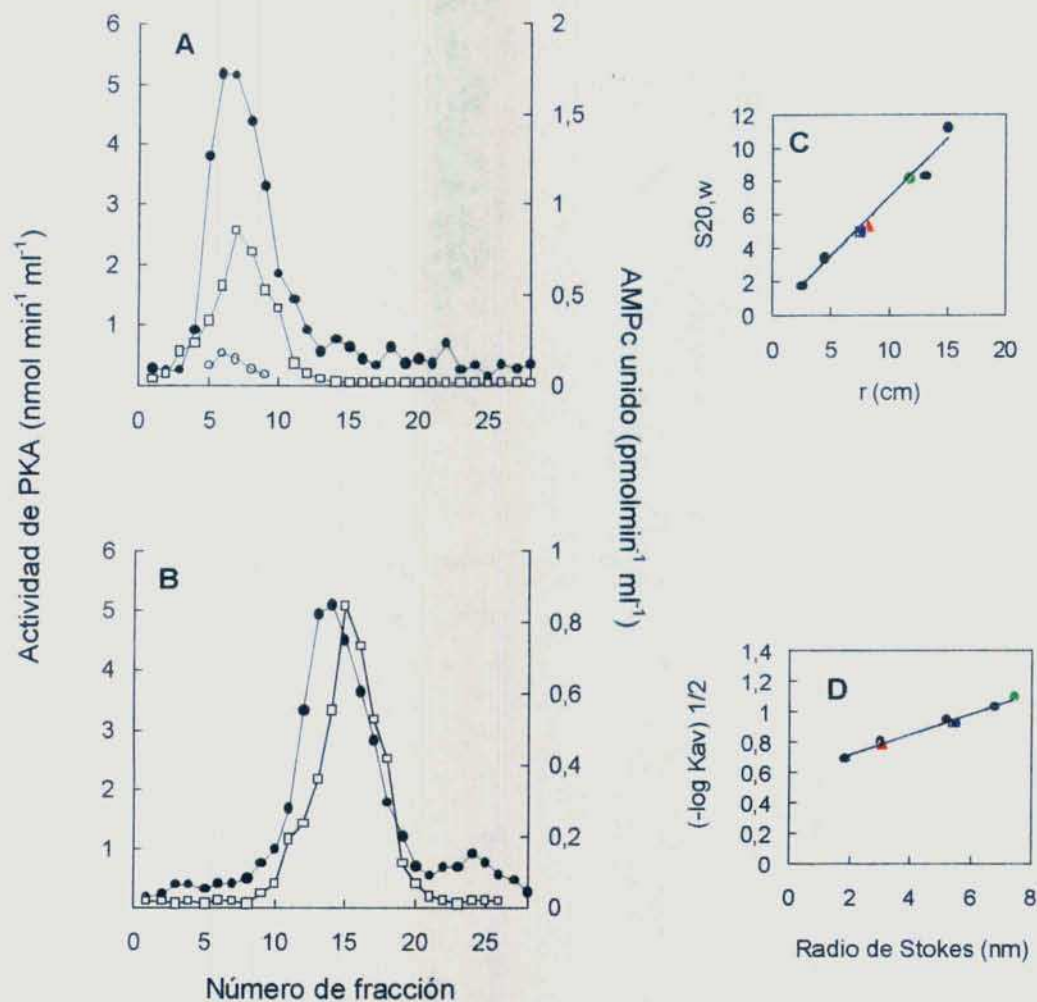


Figura R-8. Determinación de los coeficientes de sedimentación y de los radios de Stokes de la holoenzima y sus subunidades. Alícuotas de holoenzima parcialmente purificada fueron preincubadas en ausencia (A) o en presencia (B) de 5 μM AMPc[³H] durante 5 min a 30 °C. Cada muestra fue aplicada a un gradiente de sacarosa preparado según se detalla en la sección M7.1. y centrifugada a 36000 rpm durante 18 horas. Alícuotas de las fracciones de cada gradiente fueron ensayadas para actividad de PKA en presencia (●) o en ausencia (○) de AMPc 0,5 μM y para actividad ligante de AMPc (□), (C) Cálculo de los coeficientes de sedimentación, (D) Cálculo de los radios de Stokes a partir de los valores obtenidos por filtración molecular; (●) holoenzima, (■) subunidad R y (▲) subunidad C.

2.2.1.4. Determinación del cociente friccional.

Con los valores de los pesos moleculares y de los radios de Stokes se calcularon los valores de los cocientes friccionales f/f_0 aplicando la fórmula planteada en la sección M-7.4.

Los valores obtenidos fueron: holoenzima 1,70, subunidad regulatoria 1,57 y subunidad catalítica 1,09.

En la **tabla R-4** se resumen los valores de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la holoenzima y sus subunidades. Los valores hallados de los parámetros moleculares e hidrodinámicos indican que la holoenzima de *C. albicans* es una molécula grande y asimétrica. Los datos que se encuentran en la bibliografía para la mayoría de las PKAs de eucariotas superiores oscilan alrededor de 160 kDa para la masa molecular y entre 6,5 y 7,3 S para el coeficiente de sedimentación (Gill y col., 1971; Reimann y col., 1971). En organismos eucariotas inferiores tampoco se encuentran valores tan altos como el estimado en este estudio, a excepción del valor de 242 kDa informado para la holoenzima del hongo dimórfico *Mucor rouxii* (Pastori y col., 1985).

Tabla R-4. Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la holoenzima y de las subunidades regulatoria y catalítica de la PKA de *C. albicans*.

PKA	Coeficiente de sedimentación S	Radio de Stokes nm	Masa molecular kDa	Cociente friccional f/f_0
Holoenzima	8,2	7,4	287	1,70
Subunidad regulatoria	5	5,4	128	1,57
Subunidad catalítica	5,3	3,1	78	1,09

2.2.2. Cálculo de la K_m para el képtido y el ATP.

Las K_m calculadas para el ATP y para el képtido, utilizando el método de Lineweaver-Burk, fueron de 30 μM y 60 μM respectivamente. Estos valores son similares a los descritos para quinasas de proteínas dependientes de AMPc de eucariotas superiores (Lincoln y Corbin, 1977) e inferiores (Moreno y Passeron, 1985; Pastori y col., 1985, Flotow y Wheldrake, 1987).

2.2.3. Especificidad de unión del AMPc a la holoenzima.

Se estudió la capacidad de diferentes compuestos de competir con el AMPc en el ensayo de capacidad ligante de la holoenzima parcialmente purificada. El ensayo se realiza en las condiciones estándar de medición de actividad ligante de AMPc, detallada en la sección M-8.2., con el agregado de los distintos nucleótidos a las concentraciones indicadas en la **tabla R-5**. Como puede observarse en la **tabla R-5**, a una concentración de 1 μM sólo el AMPc, el dbAMPc, el 8-azido-AMPc y el GMPc fueron capaces de competir con el ligado de AMPc [3H] 0,5 μM del ensayo, siendo el AMPc el competidor más efectivo. Aún a concentraciones hasta 2000 veces mayores a la del AMPc [3H] presente en el ensayo, ATP, GTP, AMP y GMP no compitieron la unión del AMPc [3H].

Estos resultados son similares a los informados en estudios de especificidad de unión del AMPc a subunidades regulatorias de las quinasas de mamífero (Hixson y Krebs, 1980) y de hongos (Trevillyan y Pall, 1982; De Gunzburg y Veron, 1982), indicando que la unión del AMPc a la subunidad R de la PKA de *C. albicans* es altamente específica.

2.2.4. Determinación de sitios de unión de AMPc a la subunidad R de la PKA.

El análisis de la correlación entre la concentración de AMPc y la actividad de la PKA y de la cinética de disociación del AMPc unido a su subunidad regulatoria, ha sido utilizado para establecer la existencia de dos sitios de unión para el nucleótido cíclico en

prácticamente todas las subunidades R estudiadas. En consecuencia, se analizó la dependencia de AMPc de la fosforilación del kémtido, la cinética de disociación del AMPc y el efecto de análogos específicos de sitio sobre la misma para demostrar la existencia de dos sitios de unión del nucleótido a la subunidad R de la PKA de *C. albicans*.

Tabla R-5. Especificidad de unión del AMPc a la holoenzima de *C. albicans*. Alícuotas de la preparación de holoenzima parcialmente purificada fueron incubadas en las condiciones del ensayo de actividad ligante de AMPc con una concentración de AMPc[³H] 0,5 μ M en presencia de las concentraciones indicadas de cada nucleótido.

Agregados	Concentración (μ M)	AMPc unido (%)
ninguno	-	100
	10^{-2}	87
	10^{-1}	54
AMPc	1	8
	1	95
	10	70
dbAMPc	10^2	32
	1	94
	10	41
8-azido AMPc	10^2	7
	1	98
	10	66
GMPc	10^2	15
	10	100
	10^2	99
5' GMP	10^3	97
	10	100
	10^2	100
GTP	10^3	98
	10	99
	10^2	97
5' AMP	10^3	95
	10	100
	10^2	98
ATP	10^3	98

2.2.4.1. Activación por AMPc de la capacidad fosfotransferasa de la PKA.

La **figura R-9** muestra la dependencia de la concentración de AMPc de la actividad fosfotransferasa de la holoenzima. El carácter sigmoideo de la curva sugiere un efecto cooperativo positivo de la unión del AMPc a sitios diferentes. Este hecho es confirmado por la representación de los datos usando la ecuación de Hill (**figura R-9**, inserto), a través de la cual se obtiene un $n=1,6$ que corrobora la existencia de más de un sitio de unión a AMPc y la cooperatividad positiva entre ellos. La concentración de AMPc que produce un 50 % de activación ($A_{0,5}$) fue de 150 nM, este valor fue fuertemente dependiente de la cantidad de enzima utilizada en el ensayo. Una concentración de 0,3 μM de AMPc fue suficiente para producir la completa activación de la quinasa. La presencia de NaCl no tuvo efecto sobre este proceso (resultados no mostrados).

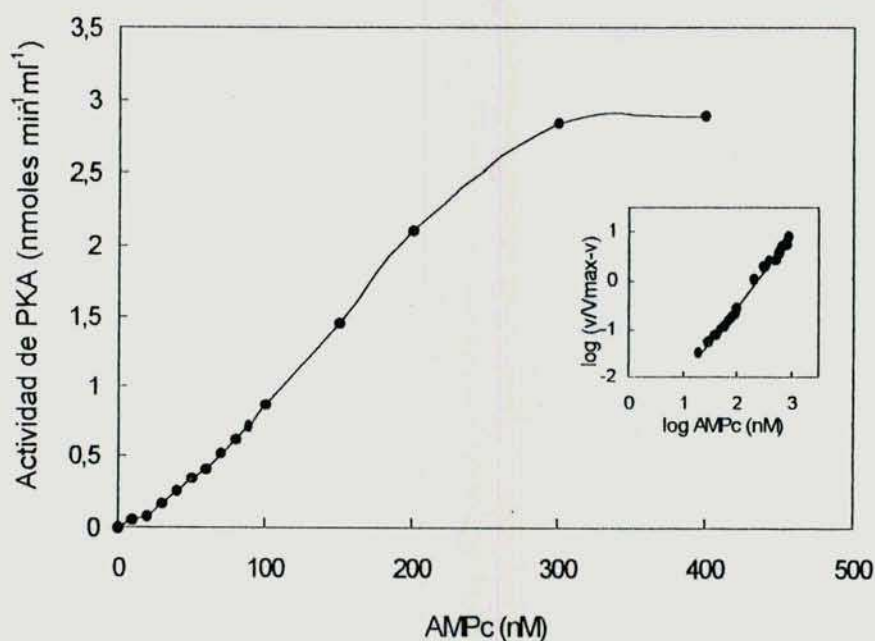


Figura R-9. Dependencia de AMPc de la capacidad fosfotransferasa de la PKA de *C. albicans*. Alicuotas de la holoenzima parcialmente purificada fueron incubadas con concentraciones crecientes de AMPc, en las condiciones estándar descritas en el ítem M-8.1. La actividad basal medida en ausencia de AMPc fue sustraída. El inserto muestra el gráfico de Hill.

2.2.4.2. Asociación del AMPc a la PKA de *C. albicans*.

La curva de unión de AMPc a la holoenzima (**figura R-10**) corrobora los datos obtenidos de la curva de activación de la capacidad fosfotransferasa por AMPc. La concentración de AMPc a la cual el 50 % de los sitios de unión al nucleótido cíclico están ocupados fue estimada gráficamente en 180 nM.

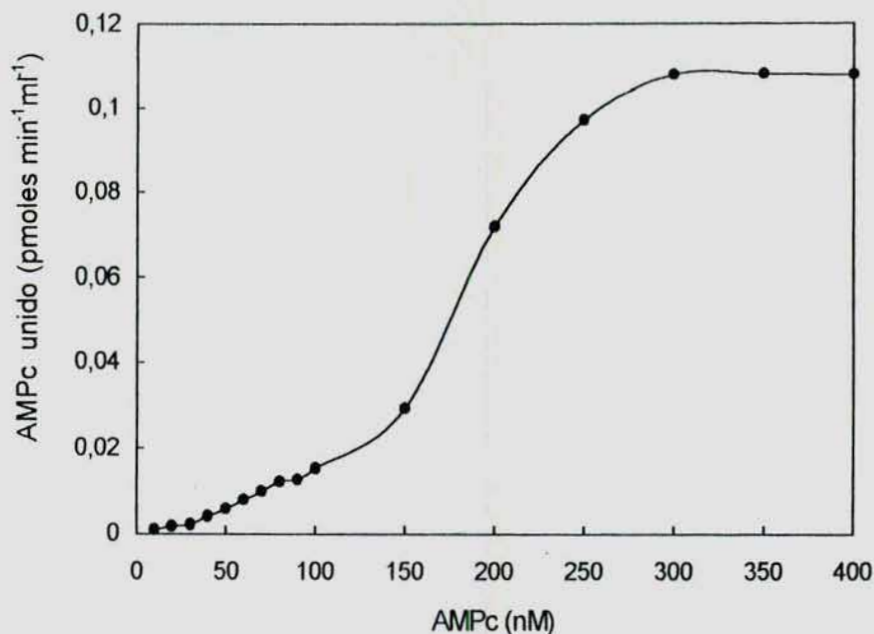


Figura R-10. Curva de asociación del AMPc a la PKA de *C. albicans*. Alicuotas de holoenzima parcialmente purificadas se incubaron con concentraciones crecientes de AMPc [H^3], en las condiciones estándar para medición de actividad ligante de AMPc que se describen en M-8.2.

2.2.4.3. Cinética de disociación del AMPc[H^3] unido a la holoenzima.

Los resultados que se muestran en la **figura R-11** ponen en evidencia una cinética de disociación bifásica que indica la existencia de dos sitios diferentes para la unión del AMPc a la PKA de *C. albicans*. La constante de disociación y la vida media, calculadas según Rannels y Corbin (1983) fueron de $0,08 \text{ min}^{-1}$ y 8,6 min para el sitio 1 (lento) y de $0,30 \text{ min}^{-1}$ y 2,3 min para el sitio 2 (rápido). Calculando gráficamente el

números de sitios de cada tipo se pudo determinar que ambos sitios están presentes en igual proporción.

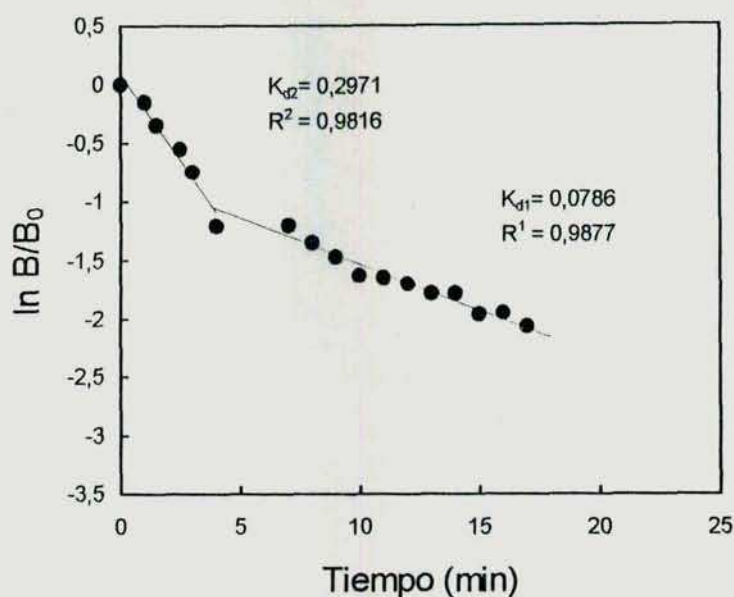


Figura R-11. Disociación del AMPc [³H] unido a la PKA de *C. albicans*. Una alícuota de la holoenzima parcialmente purificada, correspondiente a la cantidad necesaria para 30 ensayos individuales de capacidad ligante, se incubó en un volumen final de 1,2 ml durante 60 min a 30 °C, en las condiciones del ensayo estándar. EL AMPc[³H] que permaneció unido se midió a los tiempos indicados en alícuotas de 60 µl luego del agregado de AMPc no marcado 50 µM. El 100 % de ligado de AMPc corresponde a 0,3 pmoles.

2.2.4.4. Efecto de los análogos de AMPc sobre la reacción de unión del AMPc[³H] y su subsecuente disociación.

Con el propósito de proveer evidencias de que los dos putativos sitios de unión a AMPc en la holoenzima eran diferentes se llevó a cabo el procedimiento descrito por Rannels y Corbin, (1983), para el estudio de especificidad de sitio utilizando análogos del AMPc. Este procedimiento está basado en la premisa que los distintos análogos no marcados son capaces de desplazar la unión del AMPc[³H] de una manera selectiva de sitio durante la reacción de unión del nucleótido. Luego, al agregarse un exceso de AMPc no marcado, sólo el sitio que se encuentra ocupado por el AMPc[³H], y que es aquel al que no se ha unido el análogo, será el que se detecte durante la reacción de

disociación. La disociación del AMPc[^3H] fue medida luego de la unión del AMPc[^3H] en presencia de concentraciones de 8-azido-AMPc y dbAMPc que producen aproximadamente un 80 % de inhibición de la unión del nucleótido cíclico, estos dos análogos fueron elegidos por ser fuertemente selectivos para los sitios 1 y 2, respectivamente, de la PKA de mamíferos (Rannels y Corbin, 1980).

El 8-azido-AMPc, análogo selectivo de sitio 1, produjo la desaparición del componente más lento (sitio 1), mientras que el dbAMPc, análogo selectivo del sitio 2, causó la desaparición del componente rápido de la curva control (**figura R-12**).

De este modo se establece la existencia de dos sitios diferentes de unión a AMPc en la subunidad R de *C. albicans*, los cuales son positivamente cooperativos tanto en la unión del nucleótido cíclico como en la activación de la quinasa.

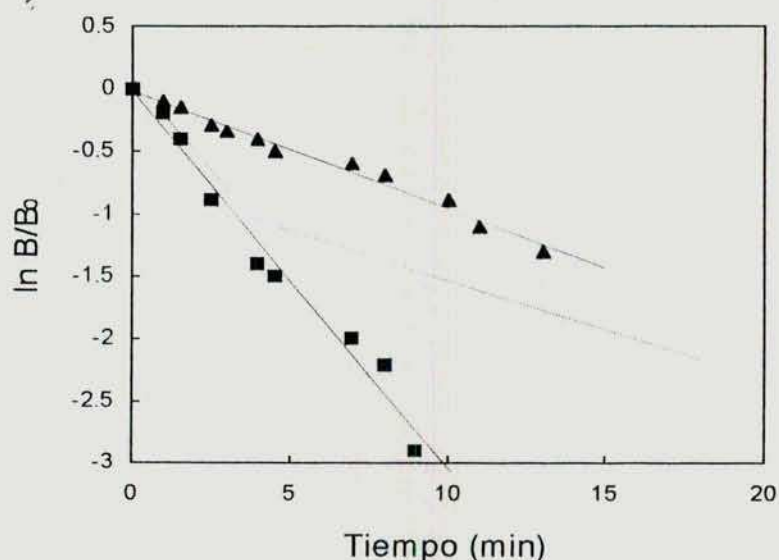


Figura R-12. *Efecto de análogos de AMPc sobre la unión del AMPc[^3H] y su disociación de la subunidad reguladora.* Alicuotas de la holoenzima parcialmente purificada equivalente a 30 ensayos individuales fueron incubadas bajo las condiciones del ensayo de unión de AMPc estándar con AMPc[^3H] 0,5 μM en presencia de 8-azido-AMPc 20 μM (■) o dbAMPc 300 μM (●). Luego de 45 min de incubación a 30 °C, se agregó al ensayo AMPc no marcado (50 μM) y se filtraron alicuotas de 30 μl a los tiempos indicados. El 100 % de unión de AMPc corresponde a 0,5 pmoles. La línea punteada representa la cinética de disociación del AMPc[^3H] en ausencia de los análogos.

2.3. Efecto de policationes sobre la activación de la holoenzima.

A lo largo de la caracterización de la PKA de *C. albicans* hemos observado que, tal como fue reportado por otros autores (Guthman y col., 1990; Miyamoto y col., 1973; Tao y col., 1972), cuando se utiliza protamina como sustrato la dependencia de AMPc de la actividad de quinasa de la PKA se ve sensiblemente disminuida. Diversas evidencias experimentales han demostrado el efecto de dominios básicos del sustrato sobre la activación de la PKA, sosteniendo un probable rol del sustrato sobre el mecanismo de activación de la enzima (Miyamoto y col., 1971; Gatica y col., 1987; Guthman y col., 1990).

Basándonos en estos antecedentes decidimos estudiar el efecto de los policationes sobre la activación de la PKA de *C. albicans*. En la **tabla R-6** se observa que 0,1 μ M de polilisina produce una marcada estimulación de la actividad de quinasa de la PKA de *C. albicans* en ausencia de AMPc (80 % de la actividad total en presencia de AMPc 0.5 μ M); concentraciones mayores de polilisina producen inhibición de la actividad fosfotransferasa.

Es de destacar que a pesar de que la PKA de *C. albicans* es marcadamente activada por polilisina su subunidad C resultó completamente insensible al efecto de los policationes, a diferencia de la subunidad C de corazón bovino la cual mostró un marcado efecto estimuladorio (**tabla R-6**); este efecto estimuladorio también ha sido informado para la subunidad C de *M. rouxii* (Guthmann y col., 1990). El hecho que la subunidad C de *C. albicans* purificada es probablemente un fragmento proteolítico de la C nativa podría dar una explicación de su insensibilidad a la polilisina, ya que podría carecer de alguna región involucrada en la interacción con el polication.

A diferencia de otras proteínas quinasas como la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) o la proteína quinasa C (PKC), la PKA se encuentra activa sólo cuando sus subunidades catalíticas y regulatorias se encuentran dissociadas. El modelo consenso, como ya fue comentado en la Introducción, sostiene que la holoenzima es catalíticamente inactiva debido a la interacción del sitio de pseudosustrato de RI, o de verdadero sustrato de RII, con el sitio de unión al sustrato en C, y que cuando el AMPc

se une a las subunidades regulatorias, la afinidad entre R y C disminuye produciendo la liberación de la subunidad C.

Tabla R-6. Efecto de policationes sobre la activación de la PKA de *C. albicans*. Alicuotas de holoenzima parcialmente purificada, subunidad C de *C. albicans* o subunidad C de corazón bovino fueron preincubadas en presencia de las cantidades indicadas de polilisina durante 5 min a 30 °C en un buffer Tris HCl 20 mM, pH 7,5; Cl₂Mg 10 mM; β-mercaptoetanol 1 mM; ATP 0,1 mM. La reacción se inició por el agregado de kémtido 0,1 mM y ATPγ[³²P] 150 mCi/mmol y se incubó durante 10 min a 30 °C. La holoenzima y la subunidad C utilizadas corresponden a los pasos de purificación de gradiente de sacarosa e hidroxipatita, respectivamente.

Polilisina (μM)	Actividad de PKA (pmol/10 min)					
	<i>C. albicans</i>				Corazón bovino	
	Holoenzima [#]		Subunidad catalítica *		Subunidad catalítica *	
—	5.5	(7)	66		46	
0.01	14.3	(38)	68	(103)	60	(130)
0.05	21.4	(57)	72	(109)	85	(184)
0.1	31	(83)	71	(107)	134	(291)
1	16	(43)	69	(104)	205	(445)
10	ND	ND	75	(113)	43	(93)

[#] Entre paréntesis se representa el porcentaje de actividad alcanzado en cada caso tomando como 100 % la actividad de PKA en presencia de AMPc 10 μM.

* Entre paréntesis se representa el porcentaje de actividad alcanzado en cada caso tomando como 100 % la actividad sin adiciones.

Según este modelo de activación, los eventos de fosforilación mediados por PKA serían selectivamente regulados por la afinidad entre el AMPc y las diferentes isoformas de R y la concentración y compartimentalización de los sustratos; sin embargo, finalmente sería siempre la subunidad C libre la que debería distinguir entre los distintos sustratos. Sin embargo, hasta el momento no se han descripto diferencias significativas entre las distintas isoformas de C en cuanto a la especificidad de sustrato. Actualmente distintas líneas de investigación plantean la necesidad de un modelo más complejo para explicar los eventos de fosforilación específica que ocurren luego de la activación de la vía del AMPc.

Con el objetivo de investigar si la activación de la PKA de *C.albicans* por policationes involucraba la disociación de la holoenzima en sus subunidades, se analizaron los perfiles de sedimentación en gradiente de sacarosa de holoenzimas previamente incubadas en presencia de polilisina. En la **figura R-13**, se muestran los perfiles de sedimentación de holoenzimas preincubadas y corridas bajo distintas condiciones. El experimento control (**figura R-13**, panel A) muestra que la actividad de PKA y de unión de AMPc cosedimentan en un único pico de coeficiente de sedimentación 8S como es de esperar para la holoenzima nativa, y que cuando la holoenzima es preincubada en presencia de AMPc 2 μ M y centrifugada en un gradiente de sacarosa conteniendo AMPc 0,5 μ M, ambas actividades se disocian y sedimentan en la posición correspondiente para las subunidades libres (5,3 S para C y 5 S para R).

Cuando la holoenzima fue preincubada en presencia de polilisina y centrifugada en un gradiente de sacarosa conteniendo la misma concentración del polication, el perfil de sedimentación obtenido correspondió al de la holoenzima nativa. En ambos casos la actividad de PKA resultó ser menos dependiente de AMPc. Esto es debido a que, por el diseño del experimento la concentración final de polilisina en el ensayo de quinasa resulta de 0,01 μ M y 0,1 μ M respectivamente (**figura R-13**, paneles B y C), estos resultados concuerdan con el grado de activación observado en la holoenzima a esas concentraciones de polilisina (ver **tabla R-6**).

El comportamiento de la enzima preincubada y corrida en presencia de polilisina es una buena evidencia del mantenimiento de la estructura tetramérica de la holoenzima activada por polilisina; estos resultados se ven apoyados por la hipótesis planteada por otros autores sobre la posibilidad de activación de la PKA sin la concomitante disociación en sus subunidades (Yang y col., 1995; Zaremborg y col., 1996).

Frente a la evidencia de la existencia de una holoenzima catalíticamente activa decidimos investigar qué otro parámetro de la misma podría modificarse en presencia de polilisina, para ello analizamos el efecto de la polilisina sobre la autofosforilación de la PKA (ver autofosforilación PKA en la sección **R-3.2.2**).

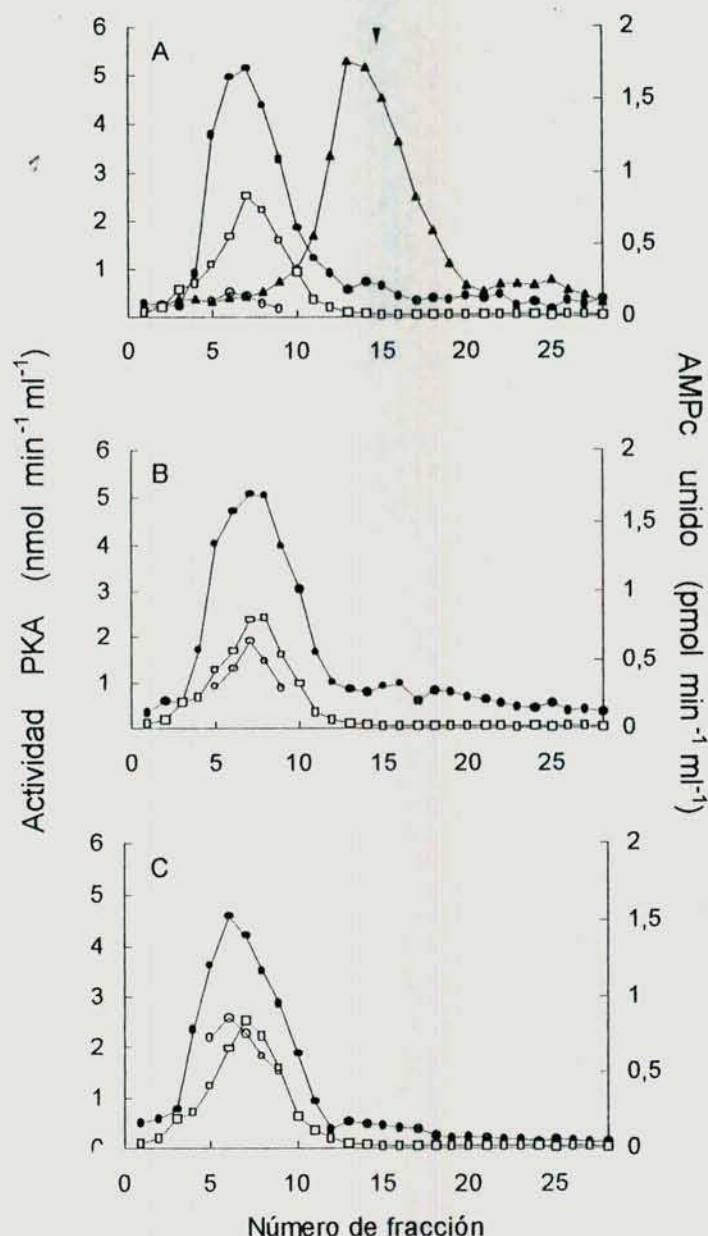


Figura R-13. Efecto de la polilisina sobre la disociación de la holoenzima de *C. albicans*. Alicuotas de holoenzima proveniente de gradiente de sacarosa fueron preincubadas separadamente durante 5 min a 30 ° en el mismo buffer descrito en la leyenda de la **tabla R-6** en presencia de kémpitido 0,1 mM y las siguientes adiciones: AMPc 5 μM o polilisina 0,1 μM o polilisina 1 μM . Cada muestra fue sembrada en un gradiente de sacarosa preparado en buffer con la misma composición del ensayo de preincubación respectivo. Alicuotas apropiadas de las fracciones de cada gradiente fueron ensayadas para actividad de PKA en presencia (●) o en ausencia (○, ▲) de 0,5 μM AMPc y para actividad ligante de AMPc (□). El panel A muestra los perfiles superpuestos del gradiente control (sin adiciones) (●, ○, □) y del gradiente de la holoenzima preincubada con AMPc 2 μM . En el último caso sólo se grafica la actividad de PKA en presencia de AMPc (▲), la flecha indica la posición del máximo de actividad de unión de AMPc. Los paneles B y C corresponden a los gradientes corridos en presencia de 0,1 μM o 1 μM polilisina respectivamente. Los símbolos son los mismos que los del panel A.

En la **figura R-14, panel A** se puede observar un efecto estimulador de la polilisina sobre la autofosforilación de la subunidad R. Dicha fosforilación no fue inhibida en presencia de 1 μ M PKI confirmando el carácter intramolecular de la reacción; este resultado demuestra que la incubación de la holoenzima en presencia de polilisina no produce su disociación (**figura R-14, panel B**).

Cuando la reacción de fosforilación se llevó a cabo en presencia de 10 μ M AMPc se observó también un efecto estimulador de la polilisina sobre la fosforilación de R (**figura R-14, panel C**), en este caso como es de esperar para una reacción intermolecular la fosforilación fue inhibida por PKI (**figura R-14, panel D**).

En ambos casos la máxima estimulación se alcanzó con una concentración de polilisina de 0.1 μ M en concordancia con lo obtenido cuando se utilizó kémptido como sustrato.

Teniendo en cuenta que, como veremos en secciones posteriores, la CK2 de *C. albicans* es capaz de fosforilar a la subunidad R resultó necesario descartar la posibilidad que el resultado observado fuera en realidad una estimulación de la fosforilación de R por CK2 contaminante. Para ello se midió la actividad de esta quinasa en la preparación enzimática utilizando como sustratos caseína y un péptido específico para CK2; con ninguno de los dos sustratos se detectó actividad de quinasa.

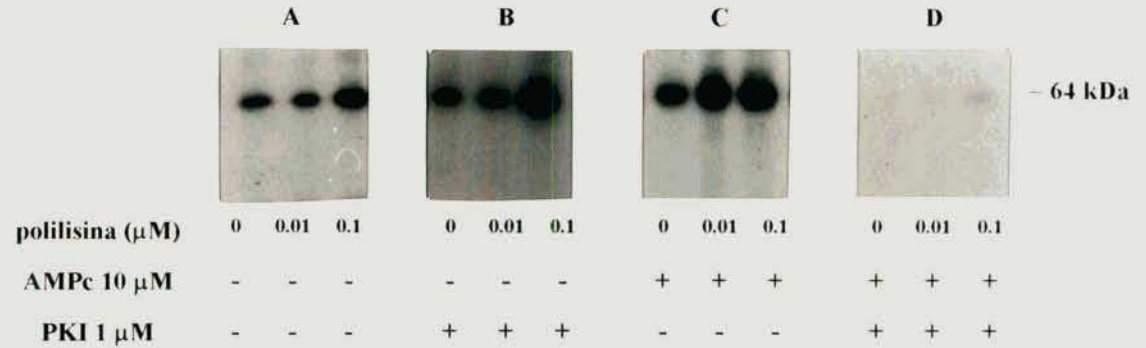


Figura R-14. Efecto de la polilisina sobre la autofosforilación de R. Aliquotas de holoenzima purificada por gradiente de sacarosa fueron preincubadas en presencia de las cantidades indicadas de polilisina durante 5 min a 30 °C en un buffer Tris HCl 20 mM, pH 7,5; Cl_2Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 1 mM, en ausencia (paneles A y B) o en presencia de 10 μ M AMPc (paneles C y D) y en ausencia (paneles A y C) o presencia de PKI 1 μ M (paneles B y D). La reacción se inició por el agregado de $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ 10 μ M 20 Ci/mmol y la incubación se realizó durante 5 min a 4 °C.

2.4. Integración.

A partir de los estudios presentados en la sección 1, los cuales, junto con trabajos previos de nuestro laboratorio, proveen significativas evidencias de la participación del AMPc en la transición dimórfica de *C. albicans* surgió la necesidad de iniciar la caracterización estructural y cinética de la PKA, principal receptor celular del nucleótido cíclico.

De acuerdo a los resultados presentados en esta sección, *C. albicans* posee un único tipo de holoenzima según se desprende de los estudios preliminares realizados en columnas de DE-52, donde tanto en levadura como en micelio la actividad de quinasa dependiente de AMPc coeluyó con la actividad de unión de AMPc en un único pico a 150 mM ClNa.

La PKA de *C. albicans* es un tetrámero de aproximadamente 287 kDa, compuesto por un dímero regulatorio de 128 kDa y dos subunidades catalíticas de 78 kDa. El cálculo de los cocientes friccionales para la holoenzima y sus subunidades muestran que la holoenzima es una proteína asimétrica, cuya asimetría está dada fundamentalmente por la estructura del dímero regulatorio, mientras que la subunidad C posee una estructura más globular.

Los parámetros cinéticos de la PKA de *C. albicans* determinados a partir de la holoenzima parcialmente purificada fueron similares a los descriptos para PKAs de otras especies. Se comprobó la naturaleza cooperativa de la dependencia de AMPc sobre la fosforilación del kémtido y se observó una curva de disociación de AMPc de carácter bifásico, lo cual demostró la existencia de dos sitios distintos de unión a AMPc en la subunidad R. La existencia de estos dos sitios se corroboró por ensayos de competencia de unión de AMPc con análogos específicos de sitio. Una concentración de AMPc 1 μ M fue suficiente para producir la completa disociación de la holoenzima como se comprobó por análisis en gradiente de sacarosa o por el ensayo estándar de medición de PKA.

Una característica interesante de la PKA de *C. albicans* es el marcado efecto estimulador que tiene la polilisina sobre su actividad fosfotransferasa sin que aparentemente medie la disociación de la holoenzima.

La activación de la PKA de diferentes sistemas por compuestos básicos ha sido previamente demostrada aunque en todos los casos la activación de la PKA por proteínas que poseen dominios básicos fue mediada por la disociación de la holoenzima.

Sin embargo la existencia de una holoenzima tetramérica activa ha sido recientemente postulada a través de análisis de estructura utilizando técnicas fisico-químicas. (Yang y col., 1995). Por otro lado Wang y col, (1991) demostraron que la mutación de las Arg⁹² y Arg⁹³, ubicadas en la región de interacción R/C, de la subunidad RII α de corazón bovino producía una holoenzima constitutivamente activa e independiente de AMPc, aunque el nucleótido cíclico era necesario para producir su disociación. Este resultado indicaría que es posible diferenciar estructuralmente regiones de interacción entre R y C que están involucradas en la disociación de la enzima, de regiones involucradas en la accesibilidad al sitio activo. Este trabajo nos permite suponer que sería posible producir cambios conformacionales en la holoenzima, por ejemplo interfiriendo en la región de interacción de las Arg⁹² y Arg⁹³, que la lleven a adquirir una estructura tal que los sustratos puedan acceder al sitio activo sin que se produzca la disociación de la holoenzima.

Estudios en *S. cerevisiae* con mutantes espontáneas de subunidad R mostraron una disminución de la dependencia de AMPc de sobre la actividad fosfotransferasa de estas PKAs mutantes, lo cual también fue explicado por existencia de una holoenzima activa no disociada (Zaremborg y col., 1996).

Podemos plantear la hipótesis que el polication podría promover un cambio conformacional en la holoenzima, de forma tal que el sitio activo se hiciera accesible a los sustratos, posibilitando su reconocimiento y fosforilación, sin producir la disociación de la enzima.

El efecto estimulador de la polilisina sobre la tasa de autofosforilación también indicaría un cambio estructural en la holoenzima de manera que, en presencia del polication el sitio de fosforilación de la subunidad R se encontraría mejor posicionado aumentando su eficiencia de fosforilación.

Por otro lado como ya ha sido demostrado en otros sistemas la autofosforilación de la subunidad R disminuye su afinidad por C. Es decir que, un aumento en la tasa de

autofosforilación promovida por policationes podría también favorecer de una manera indirecta la aparición de una estructura tetramérica menos dependiente de AMPc.

La importante estimulación que produce la polilisina sobre la actividad de PKA sugeriría la posibilidad de un rol modulador de los sustratos con dominios básicos o de compuestos policatiónicos (por ejemplo poliaminas).

3. Caracterización y purificación de las subunidades de la PKA de *C. albicans*.

3.1. Cromatografía en Mono Q de extractos de células levaduriformes.

Extractos solubles (S100) de células levaduriformes fueron sometidos a cromatografía en una columna analítica de Mono Q (FPLC), con el fin de analizar el perfil de actividad de quinasa dependiente de AMPc. Como puede verse en la **figura R-15**, panel A, la actividad de PKA eluye a 300 mM ClNa mostrando una absoluta dependencia del agregado de AMPc; esta actividad fue inhibida en un 100% por PKI (5-24) 20 μ M (ver efecto de PKI en la sección 3.3.1.).

Las fracciones con capacidad de unión a AMPc conforman un pico ligeramente desplazado del pico de actividad de PKA; sólo una fracción minoritaria, que puede observarse como un pequeño hombro del pico principal, coeluye con la actividad de quinasa. Siendo que la capacidad de unión de AMPc presente en el pico principal no está acompañada por actividad de PKA estimulable por AMPc, esta actividad muy probablemente corresponda a la subunidad regulatoria libre (ver luego paneles B y C).

Con el objeto de caracterizar los componentes de la PKA, las fracciones de la columna de Mono Q fueron sometidas a distintos análisis.

La marcación por fotoafinidad ha sido extensamente utilizada para el estudio de proteínas que unen nucleótidos cíclicos como AMPc y GMPc. El análogo de AMPc más utilizado es el 8-azido-[32 P]AMPc (Haley y col.,1975), cuya principal ventaja es su alta afinidad por la subunidad regulatoria de la PKA, permitiendo marcar específicamente la subunidad R en extractos crudos donde ésta sólo representa una fracción minoritaria de la proteína total. Alícuotas de las fracciones 21 a 47 tomadas en forma alternada, se

sometieron a marcación con el análogo de AMPc y las proteínas se resolvieron posteriormente en SDS-PAGE 12 %; el panel B de la **figura R-15** muestra la autorradiografía del gel. Como puede verse aparece una única banda marcada con una masa molecular aparente de 64 kDa; la marcación es muy intensa en las fracciones que presentan mayor capacidad de unión de AMPc y más débil en las que corresponden al hombro que acompaña la actividad de quinasa.

La fosforilación de la subunidad R por la subunidad C de la PKA a través de una reacción intramolecular, es una característica distintiva de las PKAs del tipo II (Rangel-Aldao y Rosen, 1977). Como primer abordaje para determinar si la subunidad R de *C. albicans* era capaz de autofosforilarse se analizó la fosforilación endógena de las fracciones de la columna, en condiciones de autofosforilación como se indica en la sección M-8.3. (concentración de ATP nM, ausencia de AMPc y baja temperatura); una vez concluida la reacción de fosforilación las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE 12 %. El panel C de la **figura R-15** muestra la autorradiografía correspondiente al gel; como puede observarse a partir de la fracción 37 comienza a hacerse evidente una banda marcada radioactivamente con una masa molecular aparente de 64 kDa que alcanza un máximo de marcación en la fracción 43, coincidente con la máxima actividad de PKA. La movilidad de la proteína fosforilada coincide con la de la subunidad R marcada por fotoafinidad, sugiriendo que la PKA de *C. albicans* podría ser del tipo II. También pudo detectarse la fosforilación de otras proteínas especialmente una de alto peso molecular (alrededor de 80 K) cuya naturaleza no ha sido investigada.

Tomados en conjunto los resultados expuestos en los paneles A, B y C parecen indicar que en este intercambiador aniónico fuerte se separan parcialmente la subunidad regulatoria libre y la holoenzima; así, la actividad ligante del pico principal correspondería a la subunidad R libre que se marca intensamente por fotoafinidad pero que no se fosforila mientras que la capacidad ligante del hombro del pico principal correspondería a la subunidad R que forma parte de la holoenzima, la cual por estar presente en menor cantidad se aprecia menos en la marcación por el análogo pero que es fosforilada fuertemente por la subunidad C que la acompaña formando parte de la holoenzima.

Con el propósito de identificar la subunidad catalítica de la PKA se analizó la inmunorreactividad de las fracciones de la Mono Q frente a un anticuerpo levantado contra la subunidad C de la PKA del hongo *B.emersonii*. Como puede verse en la **figura R-15**, panel D el anticuerpo heterólogo reaccionó con una proteína de 78 kDa, la cual coeluye con la actividad fosfotransferasa. Este resultado confirma el inusual tamaño de la subunidad C estimada por gradiente de sacarosa y tamiz molecular en la sección 2.2.1.

3.2. Caracterización y purificación de la subunidad regulatoria.

3.2.1. Determinación de posibles isoformas de la subunidad R en levadura y micelio de *C. albicans*.

Parte de la caracterización de la subunidad R de *C. albicans* consistió en determinar la posible presencia de isoformas en los diferentes estadios mórficos. Para ello se llevó a cabo la marcación por fotoafinidad de la subunidad R en extractos crudos de levadura y micelio. La marcación con 8-azido AMPc [^{32}P] reveló la presencia en levadura y micelio de una única forma de subunidad R de 64 kDa. La **figura R-16** muestra que la mayor parte de la radioactividad fue incorporada en una banda de 64 kDa en extractos de ambas morfologías (calles 1 y 3), observándose también la presencia de dos bandas minoritarias de 40 y 33 kDa. Las bandas de menor peso molecular probablemente representen productos de degradación proteolítica de la banda principal, ya que su cantidad relativa varió en las distintas preparaciones y existen antecedentes de la sensibilidad de R a la proteólisis en otros sistemas (Rossi y col., 1992, Marques y col., 1989; Sy y Roselle, 1981).

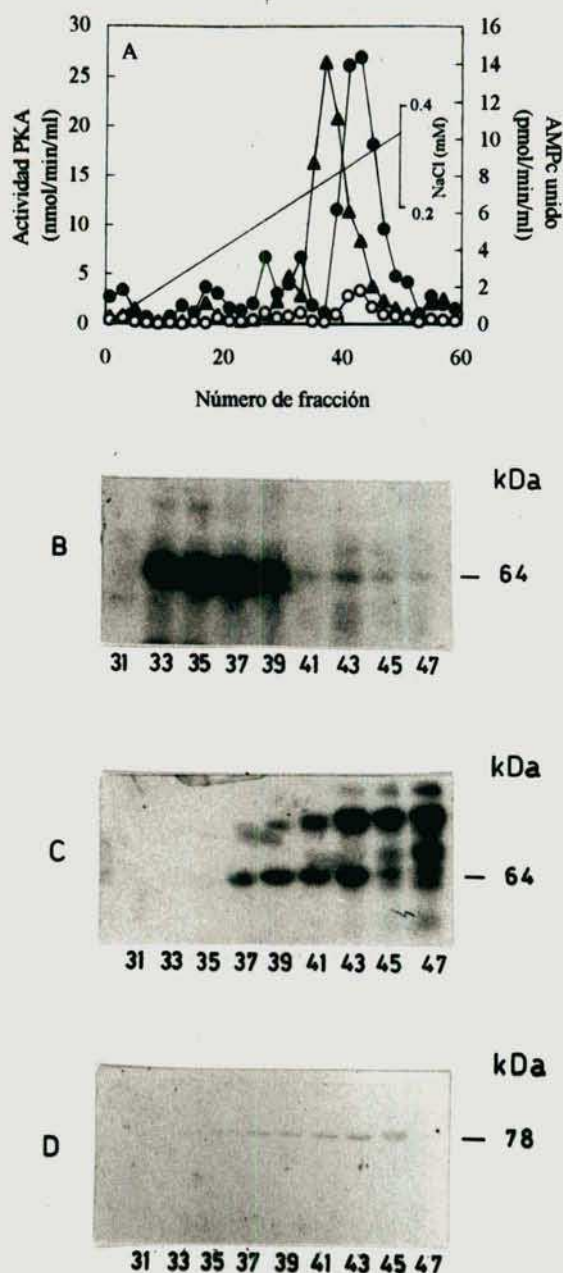


Figura R-15. Perfil de elución de la PKA de *C. albicans* en columna de Mono Q. (A) Actividad de quinasa y actividad ligante de AMPc[^3H]. Se ensayó la actividad fosforilante de kémpido en ausencia (o) o en presencia de (●) de AMPc 10 μM y la actividad ligante de AMPc[^3H] (◐) en alícuotas (5 μl) de las fracciones de la columna. (B) Autorradiografía mostrando la incorporación de 8-azido-AMPc [^{32}P] en las fracciones con actividad ligante de AMPc. Alícuotas de 10 μl de cada fracción fueron marcadas por fotoafinidad en presencia de 2 μM del análogo, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 12% y el gel fue autorradiografiado. (C) Alícuotas de 10 μl de cada fracción fueron ensayadas para fosforilación endógena con ATP[^{32}P] 50 nM(300 Ci/mmol) en ausencia de AMPc, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 12 % y el gel autorradiografiado. (D) Las proteínas de alícuotas de 20 μl de cada fracción fueron separadas por SDS-PAGE 12 %, electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa y reveladas con antisuero anti C de *B. emersonii* en una dilución 1/400. Los inmunocomplejos fueron revelados por el método cromogénico de peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario.

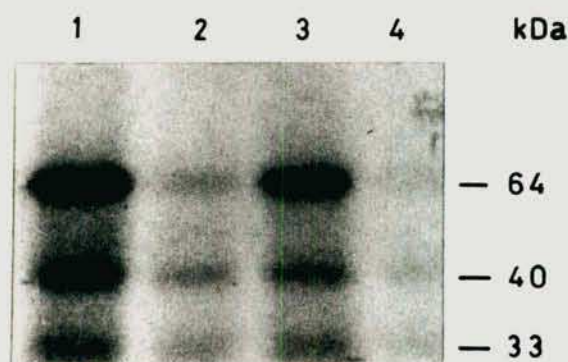


Figura R-16. Marcación por fotoafinidad de extractos crudos de levadura y micelio de *C. albicans*. Las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE 10 %. La autorradiografía muestra el patrón de incorporación de 8-azido-AMPc[^{32}P] en extractos crudos de levadura (calles 1 y 2) y de micelio (calles 3 y 4) en ausencia (calles 1 y 3) o en presencia (calles 2 y 4) de un exceso de AMPc.

La marcación con 8-azido-AMPc[^{32}P] de las bandas de 64, 40 y 33 kDa fue específica ya que el agregado de un exceso de AMPc no marcado, previo a la irradiación con luz ultravioleta, eliminó casi por completo la incorporación del análogo radioactivo (calles 2 y 4).

Estos resultados indican que, al igual que lo informado para otros eucariotas inferiores (Marques y col., 1989; Mutzel y col., 1987; Toda y col., 1987), existe un único tipo de subunidad R en *C. albicans*.

3.2.2. Autofosforilación de la PKA de *C. albicans*.

Existen por lo menos dos mecanismos a través de los cuales la subunidad R de la PKA puede ser fosforilada. Uno de ellos consiste en la fosforilación intermolecular de la subunidad R por la subunidad C en presencia de AMPc, es decir, en condiciones en que las subunidades están disociadas y el otro transcurre por medio de una reacción intramolecular catalizada por la subunidad C presente en la holoenzima sin disociar.

Las reacciones de autofosforilación intramolecular a diferencia de las reacciones intermoleculares, son eficientes a temperaturas de incubación bajas y tiempos de incubación cortos y en el caso de la PKA no es inhibida por PKI.

Con el fin de confirmar si la fosforilación de la subunidad R detectada en las fracciones de la columna de Mono Q ocurre por medio de un mecanismo intramolecular, se estudió la dependencia de la reacción con la temperatura, el tiempo de incubación y la concentración de enzima usada en el ensayo. Se utilizó como fuente de enzima, una preparación parcialmente purificada hasta la etapa de gradiente de sacarosa. Cantidades variables de esta preparación fueron incubadas en condiciones de fosforilación endógena a 30 °C durante 15 min (**figura R-17**). Para la curva de tiempo una alícuota de 5 µl de enzima fue incubada en condiciones de fosforilación endógena durante 2, 5 y 15 min a 4°C (**figura R-17**). Se observa que la banda de 64 kDa se fosforila en forma proporcional a la cantidad de proteínas utilizada en el ensayo. Esta fosforilación es prácticamente independiente de la temperatura como se puede concluir al comparar la incorporación de [³²P] a la subunidad R durante distintos tiempos a 4°C y 30°C. En ambos casos se alcanza la máxima fosforilación a los 15 min de incubación, asimismo la fosforilación a 4 °C mostró ser extremadamente eficiente ya que luego de 5 min de incubación un 80 % de la subunidad R había sido fosforilada.

Los resultados mostrados en la **figura R-17** pueden resumirse en: a) la única banda fosforilada tiene la misma masa molecular de la proteína marcada por fotoafinidad en la sección 3.1. y 3.2.1.; b) la fosforilación de esta banda de 64 kDa es proporcional a la proteína utilizada en el ensayo y no se observa saturación al aumentar la misma; c) la fosforilación de la banda de 64 kDa es independiente de la temperatura de incubación y es sumamente eficiente a 4 °C. Estos resultados sugerirían que la proteína fosforilada de 64 kDa es la subunidad R de la PKA y que la fosforilación ocurre por medio de un mecanismo intramolecular.

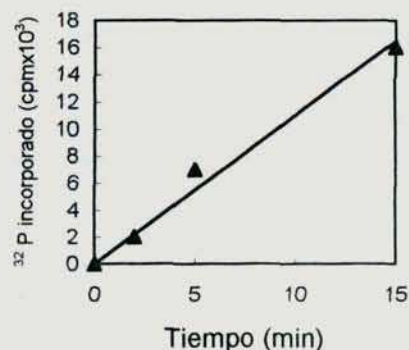
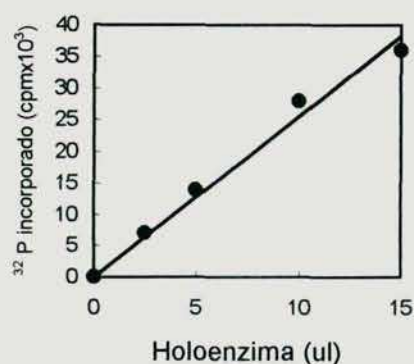
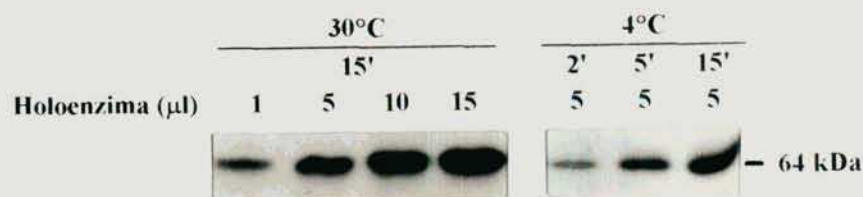


Figura R-17. Autofosforilación de la subunidad R de *C. albicans*. Cantidades variables de holoenzima parcialmente purificada fueron incubadas en los tiempos indicados a 30 °C o 4 °C en las condiciones descriptas para fosforilación endógena en la sección M-8.3. Cada mezcla de reacción fue analizada por SDS-PAGE 12 % y el gel autorradiografiado. La banda fosforilada fue cortada del gel seco y se midió la radioactividad. La radioactividad cuantificada se graficó en función de la cantidad de proteína o del tiempo de incubación según correspondiera.

3.2.3. Purificación.

Una vez determinada la existencia de un único tipo de subunidad regulatoria, se encaró su purificación a partir de células levaduriformes.

En la **tabla R-7** se resumen los pasos de purificación llevados a cabo según se detalla en Materiales y Métodos, sección M-5., para la obtención de la subunidad regulatoria de la PKA de *C. albicans*.

En la fracción de DE-52 se recuperó rutinariamente entre el 85 y el 95 % de la actividad ligante de AMPc presente en la fracción S100.

La cromatografía en columna de AMPc agarosa de la fracción de DE-52 produjo la disociación de la holoenzima en sus subunidades regulatorias y catalíticas. La subunidad catalítica fue recuperada en el percolado y el 90 % de la actividad ligante de AMPc sembrada fue retenida por la resina.

El protocolo clásico para la purificación de subunidades R por columna de AMPc agarosa fue ligeramente modificado por el agregado de dos pasos de lavado con AMP 10 mM y ATP 10 mM. El lavado con AMP permitió eliminar una proteína contaminante de aproximadamente 43 kDa cuya identidad es desconocida, mientras que el lavado con ATP eliminó la contaminación con NDP quinasa⁵; la identidad de esta proteína contaminante se comprobó por inmunorreacción con anticuerpos anti NDP quinasa de *C. albicans*.

Como era de esperar, la cromatografía en columna de afinidad fue el paso más significativo de la purificación; luego de 36 horas de diálisis para eliminar el AMPc presente en el buffer de elución se recuperó cerca del 25 % de la capacidad ligante de AMPc presente en el extracto soluble. La purificación calculada para la subunidad regulatoria resultó ser de aproximadamente unas 3000 veces.

La **figura R-18** muestra la fotografía del gel en el cual se corrió una alícuota de la preparación de subunidad R purificada. Como puede verse, la tinción con Coomassie reveló una única banda, con una masa molecular aparente de 64 kDa (calle 1). El tamaño de la proteína purificada coincide con el de la banda detectada por fotoafinidad y fosforilación en la columna de Mono Q (ver sección 3.1.) y con la de mayor tamaño visualizada en extractos crudos (ver sección 3.2.4.), por lo que podemos suponer que se ha purificado la forma intacta de la subunidad R.

⁵ NDP quinasa, nucleósido difosfato quinasa.

Tabla R-7. Purificación de la subunidad regulatoria. La purificación de la subunidad regulatoria se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos (ítem M-5).

Fracción	Proteína (mg)	AMPc unido (pmoles)	Actividad específica (pmoles/mg)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
S100	1400	976	0,69	1	100
DE-52	280	888	3,17	4,6	91
AMPc-agarosa	0,12	250	2083	3019	26

La identidad de la proteína purificada fue confirmada por dos criterios diferentes. Por un lado se analizó la inmunorreactividad de la proteína frente a un anticuerpo levantado contra la subunidad R de *B. emersonii*. En la **figura R-18**, calle 2, se observa el reconocimiento específico de la banda de 64 kDa por el anticuerpo heterólogo.

El otro abordaje consistió en fosforilar, bajo condiciones de autofosforilación, una alícuota de la preparación de DE-52 y luego purificarla a través de la columna de afinidad. Se puede observar en la **figura R-18**, calle 3, que la proteína autofosforilada purificada en estas condiciones es indistinguible de la de 64 kDa identificada antes como la subunidad R.

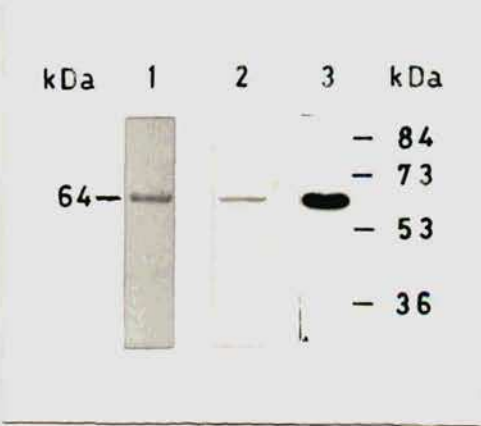


Figura R-18. Identificación de la subunidad regulatoria purificada Alícuotas apropiadas de subunidad R purificada fueron sometidas a SDS-PAGE 12%. Calle 1, 5 µg de subunidad R visualizada por Coomassie; Calle 2, Western blot de la misma preparación (2 µg) incubado con antisuero anti R de *B. emersonii* 1:500 y revelado por el método de peroxidasa cromogénico; Calle 3, R purificada a partir de extractos sometidos a autofosforilación.

3.2.4. Preparación y validación de anticuerpos específicos contra la subunidad R.

Los anticuerpos policlonales levantados contra la subunidad regulatoria de *C. albicans* fueron preparados según se detalla en Materiales y Métodos, sección 14.1. a partir de la banda de 64 kDa obtenida de un gel de poliacrilamida desnaturalizante, en el cual se corrió una preparación de subunidad R pura.

Se probó la capacidad del anticuerpo de reconocer específicamente la subunidad R en extractos crudos preparados agregando la solución de Laemmli 1 x directamente al precipitado de células y calentando durante 15 min a 100 °C con el objeto de minimizar la proteólisis que pudiera ocurrir en la preparación de las muestras.

En la **figura R-19**, calle 1 se muestra el inmunoblot de una preparación de extractos crudos, en el cual se puede observar que el antisuero reacciona fuertemente con una proteína de 64 kDa y más débilmente con dos bandas de pesos moleculares menores; el suero preinmune no reveló ninguna proteína (**figura R-19**, calle 2).

La aparición de las bandas de menor peso molecular varió entre las diferentes preparaciones de extractos, lo cual nos hace pensar que se trata de fragmentos de proteólisis de la subunidad R generados durante el proceso de extracción. Típicamente se encontraron 3 fragmentos de proteólisis de 53 kDa, 40 kDa y 33 kDa, los dos últimos coinciden con los obtenidos en la marcación de extractos crudos con 8-azido-AMPc [^{32}P] (ver **figura R-16**).

Con el objetivo de determinar la capacidad del antisuero de inmunoprecipitar la subunidad R y confirmar su especificidad se inmunoprecipitaron extractos crudos previamente marcados con 8-azido-AMPc [^{32}P] como se detalla en la sección M-8.4. En la **figura R-19**, calle 3 se muestra el SDS-PAGE de las proteínas inmunoprecipitadas con el antisuero anti R observándose la inmunoprecipitación de una única proteína marcada con [^{32}P], cuya movilidad corresponde a la de una proteína de masa molecular 64 kDa; este resultado confirma la identidad de la proteína reconocida por el antisuero.



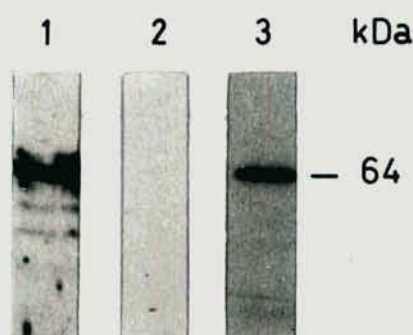


Figura R-19. Especificidad del antisuero anti R. 50 μ g de proteínas de extracto crudo fueron separadas por SDS-PAGE 12 %, electrotransferidas e incubadas con antisuero anti R dilución 1:1000 (calle 1) o suero preimmune dilución 1:1000 (calle 2) Los inmunocomplejos fueron revelados utilizando el sistema de quimioluminiscencia. Calle 3: 50 μ g de proteínas de extracto crudo previamente marcadas por fotoafinidad fueron inmunoprecipitados con antisuero anti R dilución 1:10, y separadas por SDS-PAGE 12 %, se muestra la autorradiografía del gel.

El hecho de que la proteína de mayor peso molecular reconocida por el antisuero, aún en extractos crudos, sea de 64 KDa refuerza nuestra afirmación que la subunidad R purificada corresponde a la forma nativa de la proteína. Cabe destacar la escasa susceptibilidad a la proteólisis de la subunidad R de *C. albicans* si se la compara con otras subunidades regulatorias de hongos las cuales no logran ser purificadas en su forma nativa, como es el caso de las subunidades R de *M. rouxii* y de *B. emersonii* (Marques y col., 1989; Rossi y col., 1992).

Una vez determinada la capacidad del antisuero de inmunoprecipitar la subunidad R se evaluó la capacidad del mismo de inmunoprecipitar la holoenzima de extractos crudos.

Los extractos crudos fueron inmunotitulados por incubación con cantidades crecientes del antisuero y los complejos inmunes fueron aislados por incubación con proteína A-Sepharose y posterior centrifugación; los detalles de la técnica se encuentra explicados en la sección M-14.3. Se midió la actividad de PKA y la capacidad ligante de AMPc en alícuotas apropiadas de los sobrenadantes y precipitados.

Cuando se graficó la actividad residual de PKA en los sobrenadantes versus las concentraciones de antisuero utilizadas se obtuvo una curva en la que puede observarse que 5 μ l de antisuero son suficientes para producir la inmunoprecipitación de toda la holoenzima presente en los extractos (**figura R-19**, panel A). Este resultado fue confirmado por la aparición en los precipitados de la actividad de PKA, en forma dependiente de la cantidad de antisuero agregado (**figura R-19**, panel B). Una dilución del antisuero de 1/200 produjo la inmunoprecipitación del 50 % de la actividad de PKA presente en los extractos.

En la **figura R-19**, panel B se muestra la desaparición de la actividad ligante de AMPc en los extractos crudos, se puede observar que 5 μ l de antisuero alcanzan para titular toda la subunidad R presente en los extractos. La actividad de unión de AMPc no fue inhibida por el antisuero.

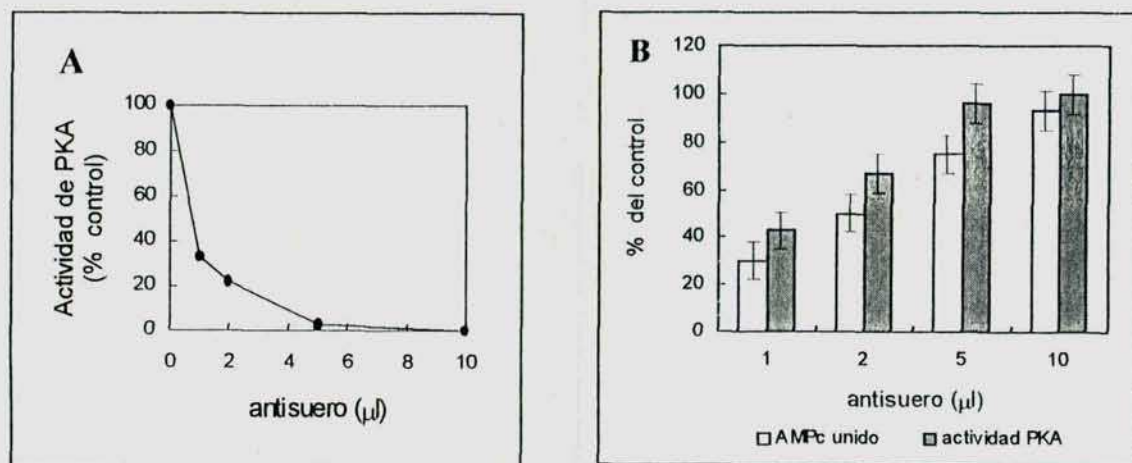


Figura R-19. Inmunotitulación de extractos crudos con antisuero anti R de *C. albicans*. 50 μ g de proteínas de extracto crudo fueron incubadas con cantidades crecientes de antisuero en 200 μ l de buffer B durante 1 hora a 4 °C seguido de un período de incubación de 30 min a 4 °C en presencia de proteína A-Sepharose. Luego de la centrifugación se midió la actividad de PKA en alícuotas de los sobrenadantes (A) y de los precipitados (B, barras rayadas) y la actividad de unión de AMPc en los precipitados (B, barras blancas). Los controles en presencia de suero preinmune se realizaron bajo idénticas condiciones de ensayo. El 100 % de la actividad de PKA y de unión de AMPc corresponde a 0,2 nmol/min/ml y 0,8 pmol/min/ml, respectivamente.

Como control de posibles interferencias o de reacciones inespecíficas producidas por factores del suero, todos los ensayos se llevaron a cabo, paralelamente, en presencia de suero preinmune; no se observó inmunoprecipitación de la holoenzima con ninguna de las concentraciones utilizadas.

Los resultados presentados demuestran que el antisuero anti R de *C. albicans* es capaz de inmunoprecipitar específicamente tanto la subunidad R libre como la holoenzima. La capacidad del antisuero anti R para inmunoprecipitar la holoenzima resultó una herramienta muy útil en la caracterización de la subunidad C (ver más adelante).

3.3. Purificación parcial y caracterización de la subunidad catalítica.

3.3.1. Purificación parcial.

La metodología utilizada para la purificación de la subunidad C se detalla en Materiales y Métodos, ítem M-6. El protocolo de purificación de la subunidad catalítica se basa principalmente en el diferente comportamiento de la holoenzima, la subunidad R y la subunidad C en un intercambiador aniónico. La subunidad C es una proteína básica, mientras que la holoenzima y la subunidad R son levemente ácidas, por lo tanto, C puede ser específicamente eluida con AMPc de una columna de DE-52 que tenga adsorbida la holoenzima; el percolado contendrá la subunidad C ya que esta por su carga no queda retenida en la columna.

Como la proteína eluye muy diluida de la columna de DE-52, el pool de fracciones con mayor actividad de quinasa se siembra en una columna de hidroxipatita, con el principal objeto de concentrar la enzima, ya que ésta queda unida a la columna al pH seleccionado. La subunidad C se eluye aplicando un gradiente lineal de 45-400 mM Pi. El perfil de elución de la hidroxipatita varió ligeramente en las distintas preparaciones. La característica más constante fue la aparición de dos picos con actividad de quinasa, aunque su proporción relativa no fue reproducible.

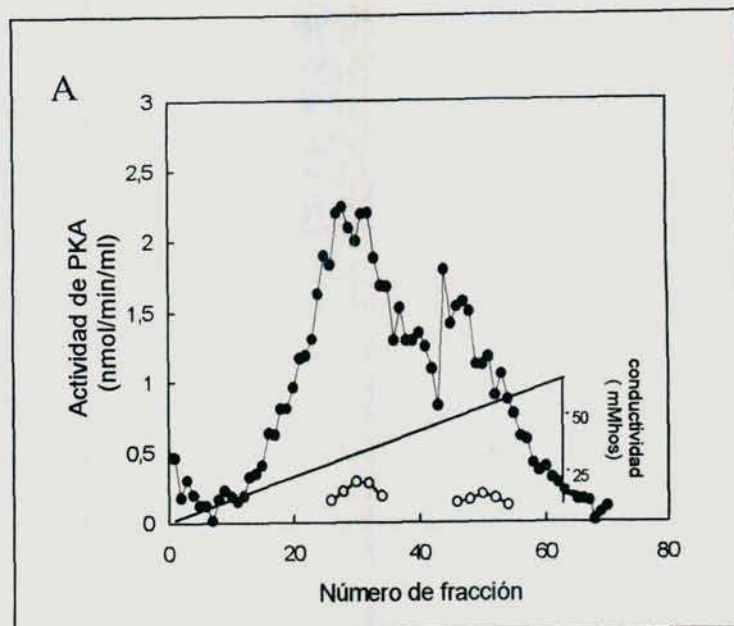
En la **figura R-20** se muestra el perfil de elución de una columna de hidroxiapatita, en paralelo con el perfil de proteínas en SDS-PAGE de las fracciones con actividad de quinasa. Como puede observarse, el pico que eluye a fuerza iónica menor se correlaciona con la presencia de una única proteína de 60 kDa mientras que el pico que eluye con mayor fuerza iónica está compuesto por varias bandas de menor peso molecular. Las fracciones del primer pico fueron elegidas como fuente de subunidad C purificada y su identidad confirmada por reacción inmunológica frente a un anticuerpo levantado contra la subunidad C de la PKA del hongo *D. discoideum* (**figura R-21**). Las proteínas presentes en el segundo pico variaron en las diferentes preparaciones por lo tanto la actividad de quinasa no pudo relacionarse con ninguna proteína en particular.

En la **tabla R-8** se resumen los pasos del protocolo de purificación de la subunidad C. Como puede observarse la recuperación de la actividad de quinasa disminuyó bruscamente en el último paso de purificación llegando a ser de sólo del 12%.

La masa molecular de la proteína purificada no coincidió con la estimada en la columna de Mono Q con anticuerpos anti C de *B. emersonii* ni con la calculada a través de gradiente de sacarosa y filtración molecular; a pesar de que toda la purificación se realizó en presencia de inhibidores de proteasas y de haberse ensayado otros abordajes para la purificación de C fue imposible evitar su proteólisis.

La susceptibilidad a la proteólisis que muestra la subunidad C, particularmente una vez que se ha dissociado de la holoenzima, podría reflejar la copurificación de alguna actividad proteolítica. Muy probablemente, la importante pérdida de actividad que se produce en el paso de purificación en la columna de hidroxiapatita podría estar relacionado con la proteólisis de la subunidad C.

El PKI (5-24) inhibió de manera competitiva la actividad de la subunidad C purificada. El valor de la K_i fue calculado gráficamente representando las inversas de las velocidades vs la concentración del inhibidor para dos concentraciones de sustrato (Dixon, 1967); el valor obtenido fue de 600 nM.



B

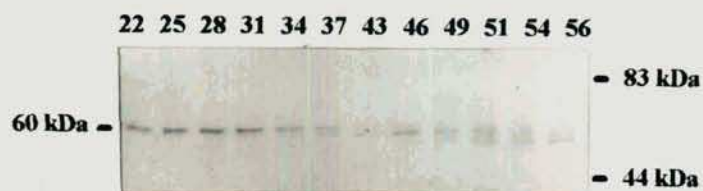


Figura R-20. Perfil de elución de la subunidad C de la columna de hidroxiapatita. (A) Perfil de elución de la actividad de quinasa. Se ensayaron alícuotas de 20 μ l de las fracciones de la columna para actividad de quinasa en ausencia (●) o en presencia (○) de PKI 1 μ M. (B) Alícuotas de 100 μ l de cada fracción fueron separadas en SDS-PAGE 12 %, se muestra el gel teñido por Coomassie.

Tabla R-8. Purificación de la subunidad catalítica. La purificación de la subunidad catalítica se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos (item M-6.).

Fracción	Proteína (mg)	Actividad (nmoles/min)	Actividad específica (nmoles/min/mg)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
S100	1000	792	0,8	1	100
DE-52	1	630	630	788	80
Hidroxiapatita	0,035 *	76	2713	3391	12

* La cuantificación de la proteína se realizó por medición espectrofotométrica a 283 nm.

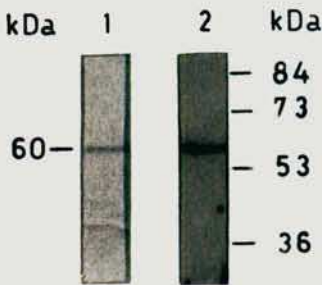


Figura R-21. Identificación de la subunidad C purificada. Calle 1, 1 µg de subunidad C purificada visualizada por Coomassie; Calle 2, Western blot de la misma preparación incubada con una dilución 1:400 del anticuerpo policlonal anti subunidad C de *D. discoideum*.

3.3.2. Reconstitución de la holoenzima de *C. albicans*.

Las subunidades regulatorias y catalíticas aisladas pueden identificarse como componentes de una quinasa de proteína dependiente de AMPc a través de su capacidad de reasociarse para formar la holoenzima correspondiente. Esta reasociación se puede detectar mediante la inhibición de la actividad fosforilante de la subunidad catalítica por el agregado de subunidad regulatoria, dicha inhibición es revertida por el agregado de AMPc.

En la **figura R-22** se puede observar que la actividad fosfotransferasa de la proteína purificada de 60 kDa fue inhibida por el agregado de cantidades crecientes de subunidad R. Como era de esperar la inhibición fue completamente revertida por el agregado de AMPc 1 μ M.

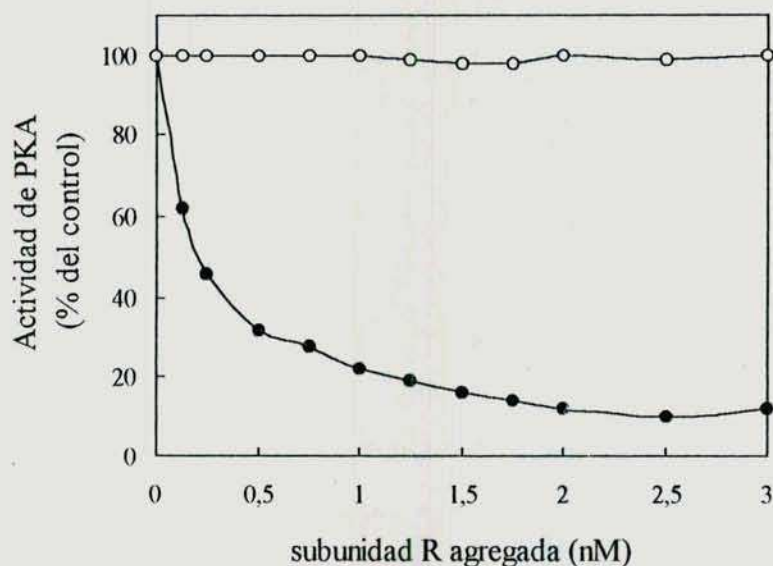


Figura R-22. Reconstitución de la holoenzima. Aliquotas de subunidad catalítica purificada (5 ng) fueron incubadas durante 15 min a 30 °C con concentraciones crecientes de subunidad regulatoria en buffer Tris HCl pH 7,5, conteniendo 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. La actividad catalítica residual fue ensayada en las condiciones estándar en ausencia (●) o en presencia (○) de AMPc 10 μ M. El 100% de la actividad catalítica representa 3 μ mol/min/mg.

La máxima inhibición se alcanza aproximadamente a una relación molar de subunidad regulatoria a subunidad catalítica de 1,5: 1. La incompleta remoción del AMPc unido a la subunidad R purificada podría explicar el exceso de R requerido para la inhibición de C, sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que la forma proteolizada de C tenga menor afinidad por R. Estos resultados confirman la identificación de la proteína de 60 kDa como un fragmento proteolítico de la subunidad C de la PKA.

3.3.3. Detección de la subunidad C nativa en extractos crudos.

La inmunoprecipitación de la holoenzima a partir de extractos crudos pareció ser un buen método para aislar rápidamente la subunidad C del resto de los componentes del lisado, evitando o al menos minimizando su proteólisis. A través de este abordaje se intentó confirmar la posibilidad de que la proteína purificada de 60 kDa proviniera de una subunidad catalítica mayor proteolizada durante la purificación

Con este fin se autofosforiló la holoenzima presente en un extracto crudo (ver M-8.3.), y se inmunoprecipitó con el antisuero anti R. El precipitado resultante (P1) fue resuspendido en buffer TrisHCl 20 mM, pH 7,5; Cl_2Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 1 mM; se separaron dos alícuotas para realizar la medición de actividad de PKA y el análisis en SDS-PAGE. La alícuota remanente fue incubada en presencia de AMPc 10 μM durante 15 min a 30 °C y centrifugada. El sobrenadante resultante (S2) se reservó y el precipitado (P2) fue resuspendido en el mismo buffer y con el mismo volumen que el P1. Alícuotas de P1, P2 y S2 fueron sometidas a SDS-PAGE 10 %, el gel fue teñido con plata y autorradiografiado. La actividad de PKA y la capacidad ligante de AMPc fueron medidas en las mismas fracciones. Como puede verse en la **figura R-23**, panel A, la tinción con plata reveló la presencia de dos proteínas (calle P1), una de ellas con la movilidad de una proteína de alrededor de 55-60 kDa, la cual probablemente corresponde a la cadena pesada de la inmunoglobulina y que enmascara a la subunidad R, y la otra, más débil, con una masa molecular aparente de 78 kDa; esta última banda está ausente en P2 y reaparece en S2 como es de esperar si correspondiera a la

subunidad catalítica liberada de P1 después del tratamiento con AMPc. También es evidente la presencia de una banda de alrededor de 55-60 kDa en el S2, probablemente derivado de pequeñas cantidades de IgG liberadas del precipitado aunque no puede descartarse que se trate en parte de subunidad C proteolizada. La autorradiografía de la **figura R-23**, panel B, confirma la presencia de la subunidad R autofosforilada en los precipitados y su ausencia en el sobrenadante. En el panel C se muestra la actividad de PKA ensayada en las fracciones P1, P2 y S2; estos resultados corroboran la identidad de las bandas visualizadas en el SDS-PAGE. La actividad de quinasa dependiente de AMPc retenida en la fracción P1, es liberada al sobrenadante S2 después de la incubación con AMPc, esta actividad es inhibible por PKI. Los resultados mostrados en la **figura R-23** indican que la subunidad C presente en células de *C. albicans* es efectivamente una proteína de 78 kDa.

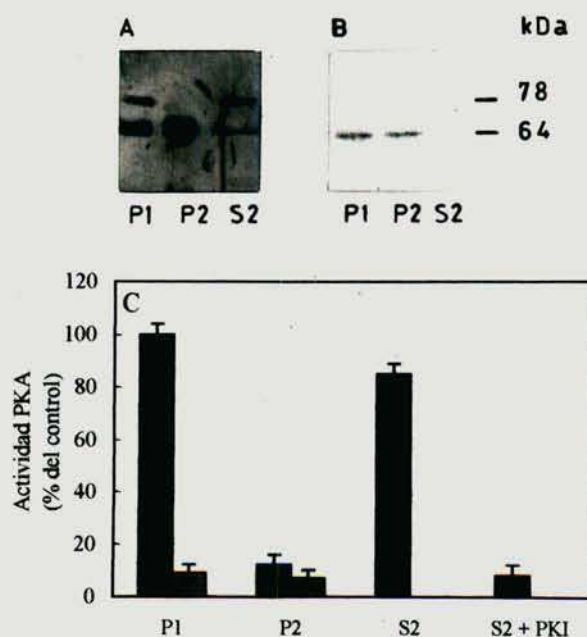


Figura R-23. Detección de la subunidad C de alto peso molecular por inmunoprecipitación con antisuero anti subunidad R. Alicuotas de extractos crudos (10 μ g de proteína) fueron autofosforiladas como se indica en el ítem M-8.3 e inmunoprecipitadas. El precipitado resultante (P1) fue resuspendido en buffer B. Una alicuota de P1 fue incubada con AMPc 10 μ M durante 15 min a 30 °C y centrifugada. El sobrenadante (S2) se reservó y el precipitado (P2) fue resuspendido en forma similar al P1. Alicuotas de P1, P2 y S2 fueron separadas por SDS-PAGE 10%, el gel teñido con plata (panel A) y autorradiografiado (panel B). El panel C muestra la determinación de actividad de PKA en alicuotas de P1, P2 y S2; la actividad de PKA se midió en ausencia (barras rayadas) o presencia (barras negras) de AMPc.

Otro abordaje para confirmar la rápida degradación proteolítica de la subunidad C, consistió en la preparación de los extractos crudos en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas y la subsecuente detección de la subunidad catalítica por inmunoblot utilizando el anticuerpo anti C de *D. discoideum*. Como se ve en la **figura R-24** cuando está favorecida la proteólisis, la especie de 60 kDa prevalece sobre la de 78 kDa, este resultado corrobora nuestra hipótesis de que una rápida proteólisis durante el procedimiento de purificación lleva a la obtención de una subunidad C de menor peso molecular.

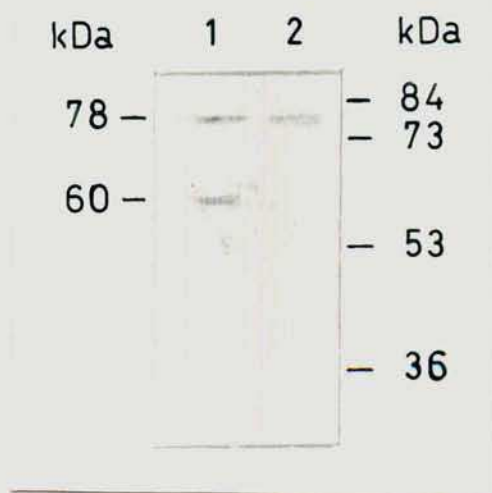


Figura R-23. Detección inmunológica de subunidad C en extractos crudos preparados en ausencia o en presencia de inhibidores de proteasas. Extractos crudos preparados en ausencia o en presencia de inhibidores de proteasas (item M-2.2) fueron sometidos a SDS-PAGE 12 % y las proteínas transferidas a nitrocelulosa (calles 1 y 2 respectivamente). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti C de *D. discoideum* 1 :400 y los inmunocomplejos revelados con el sistema de quimioluminiscencia.

3.3.4. Integración.

El análisis de extractos crudos de células levaduriformes de *C. albicans* en columna de Mono Q permitió detectar la presencia de un único pico con actividad de quinasa dependiente de AMPc. La marcación por fotoafinidad y la fosforilación endógena de las fracciones de la columna resultaron en la identificación de la subunidad R de la PKA como una proteína de 64 kDa. La capacidad de la subunidad R de sufrir

autofosforilación a través de una reacción intramolecular catalizada por la subunidad C fue claramente demostrada en la sección 3.2.2., permitiendo clasificar la PKA de *C. albicans* como del tipo II.

A pesar de que la proporción entre subunidad R libre y aquella asociada a la holoenzima varió entre las diferentes preparaciones, fue una constante la presencia de un importante pico de subunidad R libre. Por el contrario, nunca se observó la presencia de subunidad C libre. Teniendo en cuenta la extrema sensibilidad de la subunidad C a la proteólisis (ver sección 3.3.3) podemos plantear la hipótesis que si la holoenzima se encuentra parcialmente disociada *in vivo* o se disocia durante la extracción y cromatografía, la subunidad C puede ser rápidamente degradada. Se demostró que la presencia de inhibidores de proteasas en el buffer de extracción era esencial para recuperar la C de alto peso molecular, sin embargo aún en presencia de inhibidores sólo fue posible aislar y visualizar la subunidad C nativa por métodos rápidos, como inmunoprecipitación o análisis de los extractos en FPLC.

Al analizarse la actividad de PKA en extractos crudos a través de gradientes de sacarosa también pudo observarse una importante proporción de subunidad R libre (resultados no mostrados). Cuando los gradientes se realizaron en presencia de AMPc, es decir en condiciones de disociación, la actividad de unión de AMPc se recuperó casi totalmente en un pico con coeficiente de sedimentación de 5 S correspondiente al dímero de R y sólo una pequeña proporción en un pico con coeficiente de sedimentación de 3 S, el cual podría corresponder a la subunidad R proteolizada (monómero R). Por otro lado en estas condiciones se recuperó sólo un 10% de la actividad de quinasas, lo cual confirma la extrema sensibilidad a la proteólisis de la subunidad C, especialmente una vez que se ha disociado de R.

La subunidad R fue purificada a homogeneidad. La proteína purificada fue utilizada para la preparación de anticuerpos policlonales anti R. Estos anticuerpos reconocieron específicamente a la subunidad R nativa y a sus fragmentos proteolíticos y fueron capaces de inmunoprecipitar tanto la subunidad R libre como la holoenzima.

La estructura monomérica y las propiedades catalíticas de la subunidad C de *C. albicans* fueron similares a aquellas purificadas de tejidos de mamíferos y de eucariotas

inferiores. Sin embargo su inusual alto peso molecular es sólo comparable con el de la subunidad C de *D. discoideum*, cuya masa molecular de 73 kDa fue deducida a partir de la secuencia nucleotídica (Anjard, 1993); también en este caso la proteína purificada presentaba una masa molecular menor, 40 kDa (De Gunzburg y col., 1984). La discrepancia entre la masa molecular de 78 kDa determinada por la cromatografía en Mono-Q y el tamaño de la proteína recuperada después de la purificación nos demostró la extrema sensibilidad a la proteólisis de la subunidad C. La proteína de 60 kDa purificada fue validada como componente catalítico de la PKA por su capacidad de reasociarse con la subunidad R inhibiendo su actividad fosfotransferasa. La presencia de inhibidores de proteasas fue esencial para la detección de la proteína de 78 kDa en extractos crudos pero no fue efectiva para proteger la proteína nativa a lo largo de la purificación; este hecho quizás refleje la copurificación de una actividad proteolítica. Podemos concluir que la subunidad C es expresada en la célula como un polipéptido de 78 kDa la cual es específicamente reconocida por anticuerpos anti C heterólogos.

El perfil de actividad de quinasa obtenido por la cromatografía en hidroxipatita se reprodujo sistemáticamente mostrando siempre la presencia de dos picos con actividad de quinasa independiente de AMPc e inhibible por PKI. Como ya se ha dicho sólo el primer pico de actividad pudo correlacionarse con una única proteína. Una probable explicación a la presencia de dos picos de actividad podría ser la existencia de isozimas de la subunidad C o bien de una misma subunidad C que difiere en su grado de fosforilación. El conocimiento cabal de la estructura de la subunidad C sólo podrá ser dilucidado a través del clonado molecular.

4. Estudio de la fosforilación de la subunidad R de *C. albicans*.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la regulación *in vivo* de la PKA de *C. albicans* se inició el estudio y caracterización de los sitios de la subunidad R fosforilables *in vitro* por su propia subunidad catalítica y por la CK2 homóloga y se estudió el efecto de dicha modificación sobre la actividad de la enzima.

4.1. Fosforilación de la subunidad R por CK2 homóloga.

En la Figura R-24 se muestran los resultados obtenidos en un ensayo estándar de fosforilación de subunidad R por CK2 según se detalla en Materiales y Métodos sección 10.2. Se puede observar que la subunidad R es fosforilada por CK2 (carril 3), siendo esta fosforilación fuertemente inhibida por heparina (carril 2). La inhibición de la fosforilación por heparina es una característica que distingue a los sustratos de la CK2.

Cuando la reacción se realiza en presencia de polilisina se puede observar una leve estimulación en la fosforilación (carril 4). El comportamiento de los sustratos de CK2 frente a la polilisina es variable; por ejemplo, la fosforilación de la calmodulina es totalmente dependiente de polilisina mientras que la fosforilación de la caseína es estimulada por polilisina, pero no es dependiente de ella.

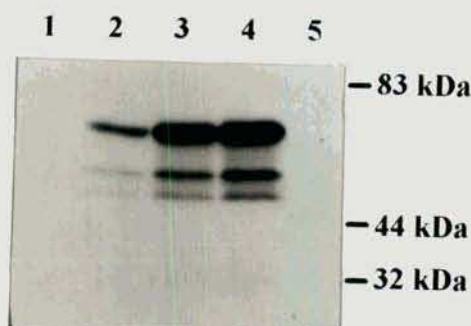


Figura R-24. Fosforilación de subunidad R purificada por CK2. La subunidad R (0.1 µg) fue incubada durante 60 min a 37 °C en condiciones de fosforilación para CK2 según se indica en el ítem M-10.2. con los agregados indicados. Las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE 12%; se muestra la autorradiografía del gel.

Carril 1: subunidad R sola.

Carril 2: subunidad R en presencia de CK2 y heparina 1,5 µg/ml.

Carril 3: subunidad R en presencia de CK2.

Carril 4: subunidad R en presencia de CK2 y polilisina 1 µM.

Carril 5: CK2 sola.

Basándonos en la secuencia aminoácídica de la subunidad R de *C. albicans*, la cual nos fue gentilmente provista por el Dr. Luc Giasson de la Universidad de Laval, Quebec, Canadá, podemos encontrar 3 aminoácidos fosforilables en la subunidad R (Ser⁹⁷, Ser²⁰⁴ y Thr²⁰⁶) ubicados en secuencias consenso para el reconocimiento por CK2. Uno de estos putativos sitios (Ser⁹⁷) se encuentra ubicado en la región N-terminal y los otros se encuentran ubicados en la región de interacción R/C (región bisagra) (ver **figura R-25**). La caracterización de la fosforilación *in vitro* de la subunidad R por CK2, realizada por la estudiante Paula Alvarez como parte de su Tesina, permitió la identificación de Ser y Thr como los aminoácidos fosforilados *in vitro* por CK2. El mapeo por proteólisis limitada con tripsina y proteasa V8 permitió la localización de los sitios fosforilados por C y CK2. Esta técnica permitió determinar que el sitio de autofosforilación se encuentra ubicado en la región bisagra y que los probables sitios fosforilables por CK2 son Ser²⁰⁴ y Thr²⁰⁶, descartando a Ser⁹⁷ como blanco de fosforilación por CK2. En la figura R-25 se muestra el esquema de la estructura de la subunidad R y de la ubicación de los fragmentos obtenidos por proteólisis con tripsina y V8 que permitieron arribar a las conclusiones antes mencionadas. Este gráfico fue tomado de la Tesina mencionada más arriba y se incluye en esta Tesis con el fin de facilitar la comprensión de dichos resultados.

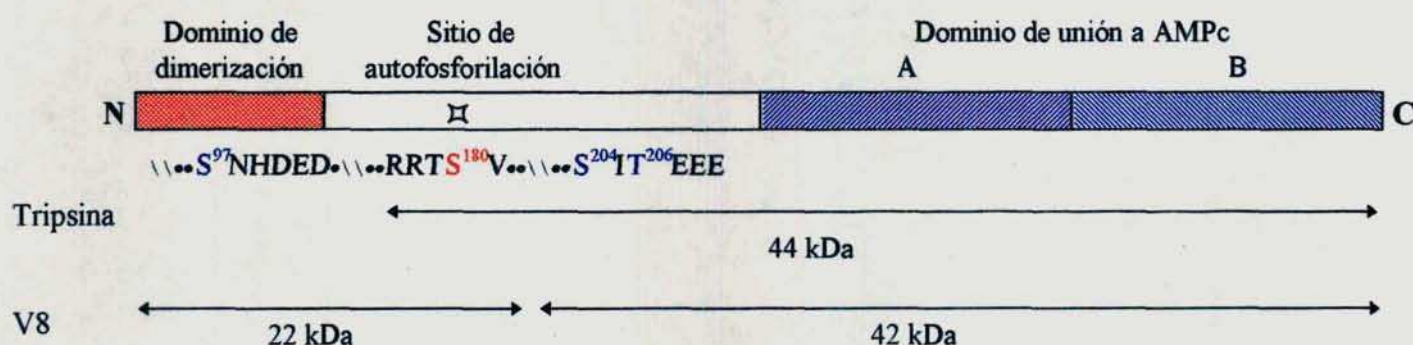


Figura R-25. Esquema de la secuencia aminoacídica de la subunidad R de *C. albicans*. En el esquema se indican la posición de los putativos sitios de fosforilación para C y CK2 en la subunidad R y los fragmentos marcados resultantes de la proteólisis con tripsina y V8. S¹⁸⁰: sitio de autofosforilación. S⁹⁷, S²⁰⁴, y T²⁰⁶: putativos residuos fosforilables por CK2.

En los últimos años se ha comprobado que no todas las fosforilaciones son eventos independientes, y que existen algunos tipos de fosforilaciones que sólo ocurren después que el sustrato ha sido previamente modificado. Este mecanismo regulatorio ha sido llamado fosforilación jerárquica. Las fosforilaciones jerárquicas se refieren a situaciones donde un primer evento de fosforilación puede influenciar la ocurrencia de una segunda fosforilación. Aunque usualmente la primera fosforilación promueve a la segunda, existen también ejemplos de efectos antagonistas entre fosforilaciones (Yeaman, 1990). Las fosforilaciones jerárquicas cumplen un importante rol en la integración de la información celular, ya que permiten crear estrategias más complejas en la intrincada trama regulatoria celular. El estudio de las fosforilaciones secuenciales de C y CK2 sobre la subunidad R arrojó resultados interesantes en cuanto a un posible rol regulatorio de la fosforilación de CK2 sobre la actividad de PKA. Se comprobó que la previa fosforilación de la subunidad R por CK2 inhibía la posterior fosforilación por C. Este resultado puede deberse a por lo menos dos causas: 1) el grupo fosfato introducido por CK2 dificulta directamente la interacción R-C o 2) la fosforilación por CK2 produce un cambio conformacional en R que transforma el sitio de fosforilación por C en un sitio desfavorable.

Los resultados obtenidos a través de la caracterización de la fosforilación *in vitro* nos llevaron a ahondar en el estudio de la fosforilación de la subunidad R por CK2 con el fin de determinar la probable implicancia fisiológica de dicha fosforilación como moduladora de la actividad de PKA *in vivo*.

4.2. Fosforilación de la holoenzima por CK2.

La proximidad del sitio de fosforilación por CK2 a la Ser⁸⁰ del sitio de autofosforilación, ubicado en la región de interacción de R/C, nos hizo pensar en la posibilidad de que los sitios fosforilables por CK2 en la subunidad R se encontraron enmascarados cuando ésta se encuentra formando parte de la holoenzima.

Sin embargo, como puede verse en la **figura R-26** la subunidad R es sustrato de la CK2 aún cuando se encuentra formando parte de la holoenzima (calle 4). Llamativamente la fosforilación de R por CK2 es significativamente más dependiente de polilisina cuando se encuentra formando parte de la holoenzima que cuando se encuentra disociada de C por efecto del AMPc (comparar carriles 3 y 4 con 7 y 8). Esto podría explicarse basándonos en la hipótesis, planteada previamente (**sección R-2.4**), en la cual sosteníamos que la polilisina podría estar actuando sobre la holoenzima provocando un cambio conformacional que dejaría el sitio activo accesible a los sustratos. En este caso en particular, podríamos suponer que la polilisina produce un cambio conformacional en la PKA tal que expone el sitio de fosforilación para CK2, el cual en la holoenzima nativa (en ausencia de polilisina) se encontraría parcialmente enmascarado.

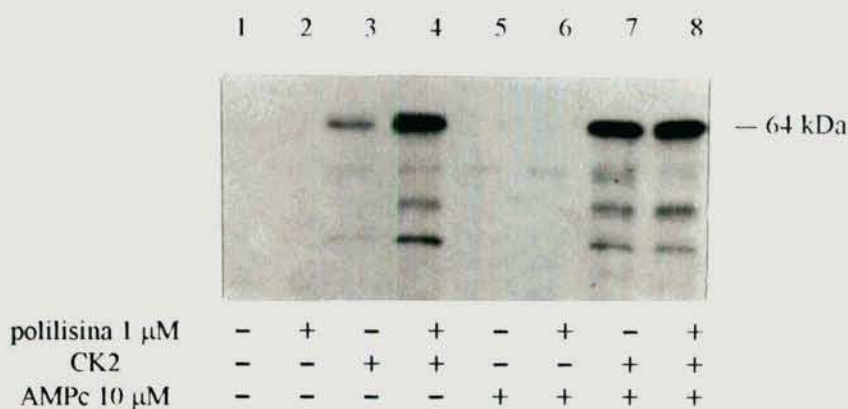


Figura R-26. Fosforilación de la holoenzima por CK2. Holoenzima purificada hasta el paso de gradiente de sacarosa fue previamente incubada durante 60 min a 30 °C en Tris HCl 50 mM pH 8,5 conteniendo β -mercaptoetanol 2 mM, Cl_2Mg 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ATP 50 μ M e inhibidores de fosfatasas con los agregados indicados en la figura. Luego se incubó en presencia (calles 3, 4, 7 y 8) o en ausencia de CK2 (calles 1, 2, 5 y 6) y $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ durante 30 min a 37°C. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE 12 %; se muestra la radiografía del gel.

4.3. Efecto de la fosforilación de CK2 sobre la actividad biológica de la subunidad R.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la fosforilación por CK2 sobre la función de la subunidad regulatoria, se realizaron experimentos de reasociación utilizando la R fosforilada por CK2.

En un primer ensayo la subunidad R fue preincubada durante 30 min en condiciones de fosforilación, en ausencia o en presencia de CK2 (1° etapa). Luego se agregó la subunidad C y se incubó durante otros 30 min (2° etapa); finalizada esta incubación se agregó $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ y kémtido 50 μM y se determinó la actividad fosforilante sobre kémtido después de 10 min de incubación. Como control en ensayos previos se corroboró que la CK2 no es capaz de fosforilar al kémtido.

Como puede verse en la **figura R-27, panel A** la preincubación con CK2 resultó en un corrimiento hacia la derecha de la curva de reasociación, indicando que la subunidad catalítica fue menos inhibida por la R fosforilada debido a que la reasociación de ambas fue desfavorecida por la previa fosforilación de R por CK2. La disminución observada de la actividad catalítica no fue producida por inactivación térmica de C o depleción de ATP, ya que el agregado de AMPc 10 μM a la mezcla de preincubación resultó en niveles estables de actividad de quinasa que fueron insensibles a R en todo el rango de concentraciones utilizadas. La disminución de la afinidad de la R fosforilada por CK2 fue dependiente del tiempo de incubación con C (**figura 27, panel B**).

Como control de que la subunidad R era efectivamente fosforilada por CK2 durante la preincubación y que no era desfosforilada en las posteriores incubaciones, se realizó en paralelo el mismo experimento excepto que el $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ se agregó inicialmente; alícuotas del ensayo tomadas al final de la 1° y 2° etapa fueron analizadas por SDS-PAGE comprobándose la fosforilación de R (resultados no mostrados).

La modificación en la afinidad de R por C, dada por la fosforilación de la CK2, podría funcionar como un mecanismo regulatorio de la actividad de la PKA *in vivo*, manteniendo a la enzima en estado activo ya sea por inhibir la reasociación o por favorecer la disociación de la holoenzima, ya que como hemos visto la holoenzima es sustrato de la CK2.

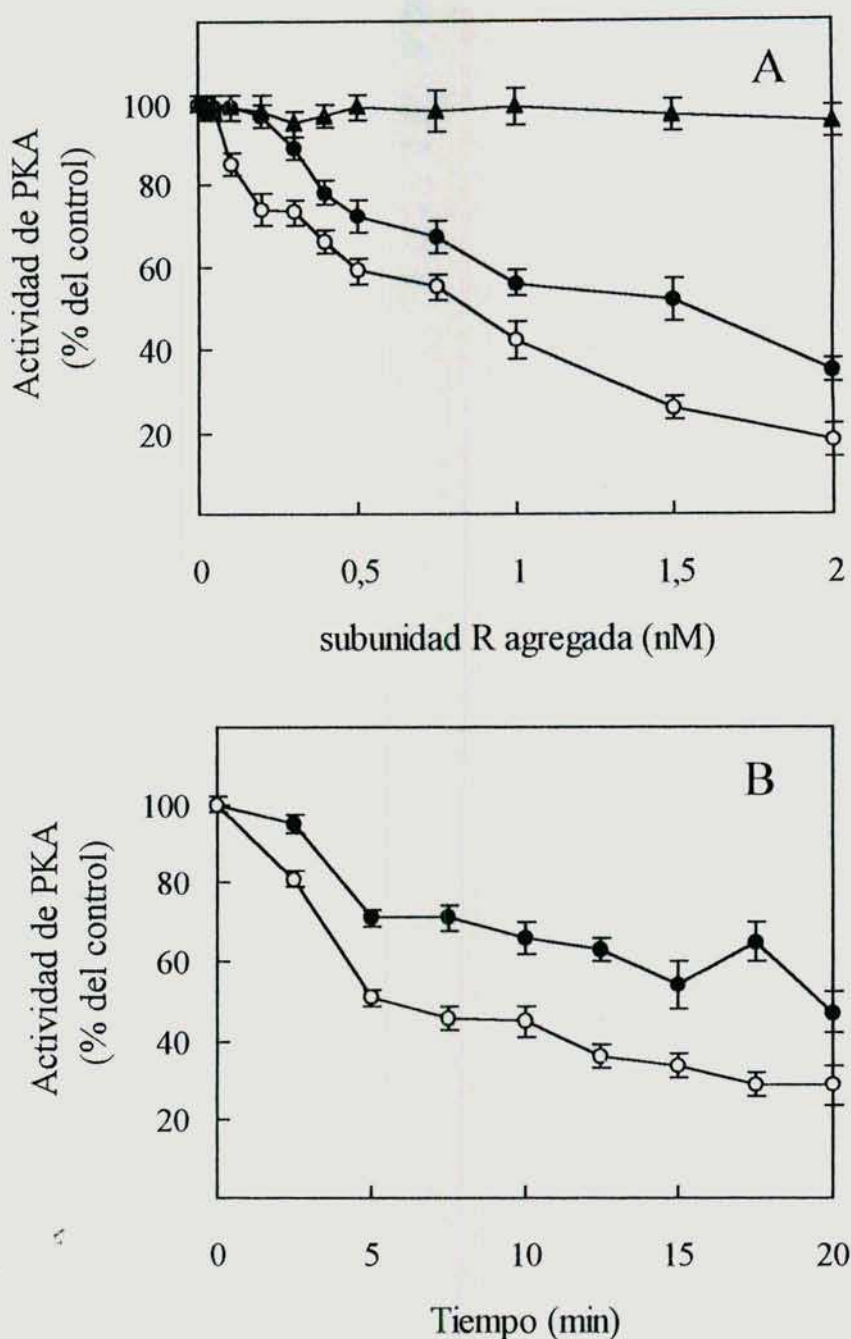


Figura R-27. Análisis cinético de los efectos de la fosforilación de R por CK2 sobre la actividad de PKA. (A) concentraciones crecientes de subunidad R pura fueron preincubadas durante 30 min a 37 °C en buffer Tris HCl 50 mM pH 8,5, conteniendo β -mercaptoetanol 2 mM, Cl_2Mg 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ATP 50 μM , 1 mg/ml de albúmina sérica bovina e inhibidores de fosfatasas y proteasas, en presencia (●) o en ausencia (○) de CK2. Luego se agregó subunidad C y se incubó durante 30 min a 30°C. Finalizada la incubación se agregó kémpitido 50 μM y $\text{ATP}\gamma[^{32}\text{P}]$ y se incubó durante 10 min. El control de la reacción se realizó en presencia de AMPc 10 μM (▲). (B) Las condiciones del ensayo fueron similares que en (A) con la excepción que la concentración de R se mantuvo constante (1,5 nM) y el tiempo de incubación con la subunidad C fue variable. La actividad catalítica residual fue ensayada en condiciones estándar en ausencia de AMPc. El 100% de la actividad catalítica representa 3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

4.4. Estudio de la fosforilación *in vivo* de la subunidad R de *C. albicans*.

Con el objetivo de determinar la posible relevancia fisiológica de la fosforilación de R por CK2 y C se inició el estudio de la fosforilación *in vivo* de R durante la morfogénesis.

La marcación *in vivo* se llevó a cabo por inducción de la germinación de blastosporas en medio conteniendo [^{32}P] ortofosfato; las condiciones del ensayo se detallan en la sección M-11.1.

Se analizó la fosforilación de R a distintos tiempos del proceso de diferenciación por inmunoprecipitación con antisuero anti R de extractos crudos de células marcadas *in vivo*. En la **figura R-28** se puede observar un aumento en la cantidad de R fosforilada a lo largo de la morfogénesis. Este aumento parece estar dado más por un aumento en la cantidad de subunidad R total, que por un aumento en la tasa de fosforilación de la misma, ya que cuando las mismas preparaciones fueron analizadas por Western blot con antisuero anti R se observó un aumento en la cantidad de R a lo largo de la morfogénesis.

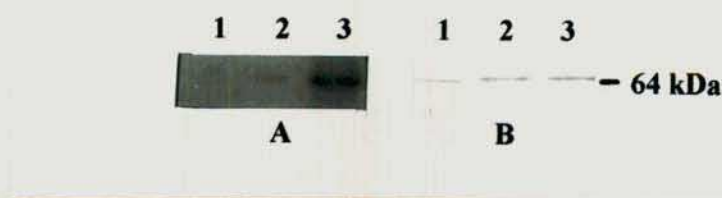


Figura R-28. Fosforilación *in vivo* de la subunidad R durante la morfogénesis. La inducción de la germinación se llevó a cabo con NAcGlc en medio MIG sin fosfatos en presencia de 4 mCi de [^{32}P] ortofosfato disódico a 37 °C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, se centrifugaron, y se prepararon extractos crudos por ruptura de las células con perlas de vidrio. Los extractos crudos de los tiempos 20 min (calle1), 40 min (calle 2) y 60 min (calle3) fueron inmunoprecipitados. La proteína inmunoprecipitada fue sometida a SDS-PAGE 12 % y transferida a Immobilon. Panel (A) autorradiografía de la membrana, panel (B) western blot de la membrana incubada con anti R 1:500, y revelada con proteína A-Sepharose unida a peroxidasa, se utilizó el sustrato cromogénico.

4.4.1. Determinación del aminoácido fosforilado *in vivo*.

La determinación del residuo aceptor de fosfato se realizó a partir de la subunidad R inmunoprecipitada a los 60 min de la inducción como se indica en la sección M-11.1. Este tiempo fue elegido con el fin de obtener una máxima fosforilación ya que la técnica utilizada implica una importante e inevitable pérdida de muestra a través del proceso.

Los resultados obtenidos determinaron que la subunidad R de *C. albicans* se encuentra fosforilada *in vivo* sólo en serina (**figura R-29**). Es interesante destacar que a pesar de que el antisuero anti R es capaz de inmunoprecipitar a la holoenzima (ver sección M-3.2.4.) no se detectó ninguna otra banda fosforilada en el inmunoprecipitado. Este hecho podría indicar dos cosas: 1) la subunidad C no se encuentra fosforilada *in vivo* o 2) la sensibilidad del ensayo sólo permite detectar la fosforilación de R debido a que ésta se encuentra en mayor proporción que C (recordar la gran cantidad de R libre presente en los extractos).

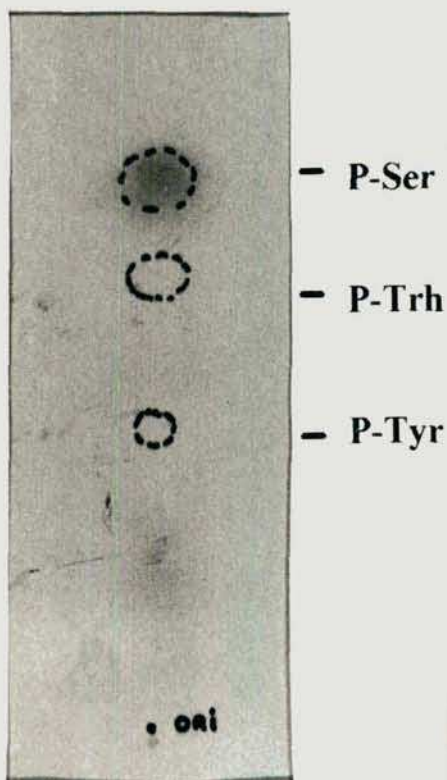


Figura R-29. Determinación del aminoácido fosforilado *in vivo*. Autorradiografía de la placa delgada de microcelulosa donde se corrieron las muestras hidrolizadas según se explicó en la sección M-12. Con líneas de puntos se indica la posición de los aminoácidos estándares revelados con ninhidrina.

4.4.2. Mapeo por clivaje químico de los sitios fosforilados *in vivo*.

La primera etapa del mapeo peptídico consistió en poner punto la técnica de clivaje con BrCN para la subunidad R pura. Para obtener fragmentos que permitieran distinguir entre los sitios de fosforilación por CK2 y por C en la subunidad R, fue necesario utilizar una variante de la técnica de clivaje con BrCN que permite la ruptura en residuos triptofano (W) y metionina (M), ya que la técnica clásica de BrCN cliva sólo en metionina (ver **figura R-30**). Para ello subunidad R pura previamente fosforilada por C, CK2 o C y CK2 simultáneamente, fue sometida a clivaje con BrCN en las condiciones que se detallan en la sección M-13.2..

En la **figura R-31, panel A** se observa que cuando la subunidad R es previamente fosforilada por C los fragmentos marcados que se obtienen son de 44 kDa para el corte en M y de 25 kDa para el corte en W y M (calles 1 y 2, respectivamente). Si la fosforilación de la subunidad R se realiza con CK2 los fragmentos marcados obtenidos son de 44 kDa para la ruptura en M y 20 kDa para la ruptura en W y M (calles 3 y 4, respectivamente). Por último se realizó como control el clivaje de la subunidad R fosforilada por ambas enzimas, y como era de esperar, cuando el clivaje ocurre en M el fragmento obtenido es de 44 kDa, en cambio cuando el clivaje es en M y W, se obtienen los dos fragmentos esperados de 25 y 20 kDa (calles 5 y 6, respectivamente).

Una vez puesta a punto la técnica se procedió a comparar el mapeo peptídico de R marcada *in vitro* con el de R marcada *in vivo*. La subunidad R fue aislada por inmunoprecipitación de extractos crudos marcados *in vivo*; la proteína precipitada se separó en SDS-PAGE y se transfirió a membrana de nitrocelulosa. Se cortó la banda fosforilada y se sometió la membrana a clivaje por BrCN en residuos M y W. La comparación de las autorradiografías de la **figura R-31, panel A** (calles 6 y 7) y del **panel B** (calles 2 y 3) muestra que todos los péptidos generados a partir de la fosforilación de R *in vivo* coinciden con los fragmentos generados a partir de la R fosforilada por C y CK2 simultáneamente. Estos resultados sugieren que la subunidad R es fosforilada *in vivo* por C y CK2, sin embargo la posibilidad de que existan sitios adicionales de fosforilación no puede ser descartada.



Figura R-30. Mapeo por clivaje químico de los sitios fosforilados en la subunidad R.

(A) Mapeo peptídico de subunidad R pura fosforilada *in vitro* por C (calles 1 y 2); por CK2 (calles 3 y 4) o por C y CK2 (calles 5 y 6).

Calles 1, 3 y 5: tratamiento con BrCN 1 mg/ml, 70 % ácido fórmico, clivaje en M.

Calles 2, 4 y 6: tratamiento con BrCN 1 mg/ml, IK 12 mM, 10% ácido fórmico, clivaje en M y W.

(B) Mapeo peptídico de subunidad R fosforilada *in vivo*.

Calle 1: subunidad R 70 % ácido fórmico.

Calle 2: clivaje en M.

Calle 3: clivaje en M y W.

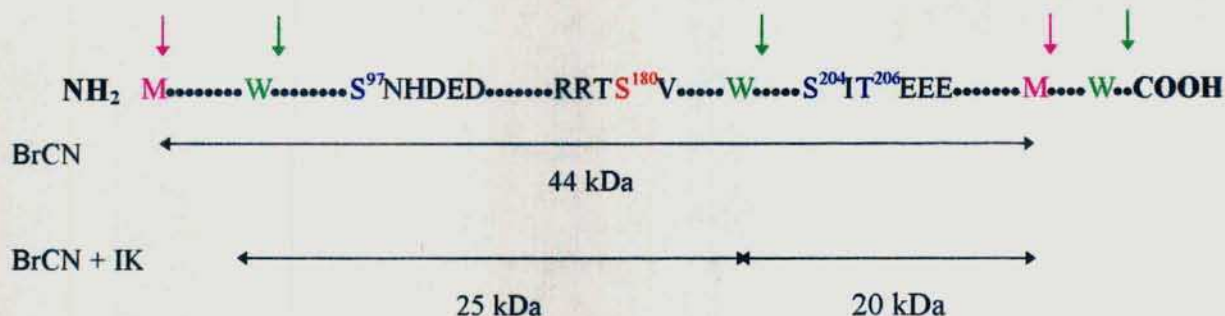


Figura R-31. Esquema de los sitios de clivaje químico en la secuencia aminoácida parcial de la subunidad R. En el esquema se indican la posición de los putativos sitios de fosforilación para C y CK2 en la subunidad R y los fragmentos marcados resultantes de la proteólisis con BrCN (—→) y con BrCN y IK (—→).

S^{180} : sitio de autofosforilación.

S^{97} , S^{204} , y T^{206} : putativos residuos fosforilables por CK2.

4.5. Integración.

La fosforilación reversible de proteínas es uno de los principales mecanismos a través de los cuales es posible regular la función de proteínas involucradas en una variedad de procesos celulares.

Es sabido que la autofosforilación de la subunidad RII de la PKA disminuye la tasa de reasociación con C potenciando la actividad quinasa resultante (Erllichman y col., 1974, Rangel-Aldao y col., 1976, Rubin y col., 1975). La alteración de la afinidad de R por C a través de la autofosforilación ha sido demostrado con subunidades R aisladas de fuentes tan diversas como mamíferos y hongos (Rangel-Aldao y Rosen, 1976; Rossi y col., 1992). De hecho en *S. cerevisiae* el reemplazo en la subunidad RII de la serina del sitio de autofosforilación por una glicina o una alanina aumenta la afinidad de R por C de 2 a 10 veces comparada con la subunidad R salvaje (Kuret y col., 1988).

La relevancia fisiológica de la autofosforilación de RII es aún incierta. Sin embargo siendo que una vez que las subunidades R y C se han disociado, la reasociación de la subunidad R fosforilada es más lenta que la de la R desfosforilada, la tasa a la cual la subunidad R es desfosforilada después que los niveles de AMPc han vuelto a las concentraciones basales, podría afectar significativamente el patrón temporal de la actividad quinasa en la célula.

La subunidad RII puede potencialmente ser modulada por fosforilaciones heterólogas. Se ha reportado que la RII bovina es fosforilada por la glucógeno sintetasa quinasa 3 (Hemmings y col., 1982) y por CK2 (Carmichael y col., 1982), sin embargo la relevancia fisiológica de estas fosforilaciones no ha sido determinada. Trabajos más recientes proveen evidencias para un probable rol regulatorio de las fosforilaciones heterólogas sobre la actividad biológica de la PKA. Braun y col. (1991) determinaron que la fosforilación de la RII bovina por la proteína quinasa dirigida por prolina (PDPK) resultaba en la atenuación de la actividad fosforilante de la PKA; por otro lado, Keryer y col. (1993) demostraron la fosforilación *in vitro* de la RII β por la P34^{cdc2} y el efecto inhibitorio de dicha fosforilación sobre la interacción con la MAP2⁶.

⁶MAP2, proteína 2 asociada a microtúbulos. Forma parte de las proteínas asociadas a R (AKAPs).

En el presente trabajo decidimos estudiar la fosforilación de la subunidad R de *C. albicans* teniendo como principal objetivo caracterizar la fosforilación por CK2 y su probable rol en la modulación de la actividad regulatoria de la subunidad R.

Los resultados presentados indican que la subunidad R es un putativo sustrato de CK2, siendo fosforilada a través de una reacción estimulable por polilisina e inhibible por heparina.

Como ya se ha dicho los estudios realizados por mapeo peptídico enzimático de los sitios fosforilados *in vitro* en la subunidad R, conjuntamente con el conocimiento de su secuencia aminoacídica permitieron determinar como posibles aminoácidos fosforilables por CK2 a Ser²⁰⁴ y Thr²⁰⁶. Dichos residuos se encuentran ubicados hacia el extremo C-terminal del sitio de autofosforilación dentro del dominio de interacción con la subunidad C.

Se determinó que la subunidad R es fosforilada por CK2 aún cuando se encuentra formando parte de la holoenzima. Sin embargo en este caso la fosforilación por CK2 resultó ser mucho más dependiente de polilisina. Este resultado podría confirmar de alguna manera la hipótesis expresada en la sección 2.3. en cuanto al cambio conformacional que produciría la polilisina en la holoenzima, el cual podría permitir desenmascarar el sitio de fosforilación de R por CK2 en la holoenzima.

Cuando se analizó el efecto de la fosforilación de R por CK2 sobre la reasociación de R-C se observó una disminución de la capacidad inhibitoria de la subunidad R sobre C. De este modo podríamos plantear que el efecto final de la fosforilación de R por CK2 produciría un efecto estimulatorio sobre la actividad de PKA, ya sea por disminuir la capacidad inhibitoria de R sobre C, como se ha demostrado, o por favorecer la disociación de la holoenzima si suponemos que la R fosforilada por CK2 tiene menor afinidad por C. En el presente estudio logramos controlar algunas, pero no todas, las posibles interacciones que ocurren entre las proteínas en la mezcla de reacción. En ese sentido podemos afirmar que durante el ensayo no ocurre desnaturalización térmica de la subunidad C, depleción de ATP ni desfosforilación de la subunidad R en la segunda etapa. Sin embargo las conclusiones obtenidas a partir del análisis cinético de sistemas que contienen más de una quinasas

simultáneamente tienen ciertas limitaciones; en nuestro caso no podemos descartar posibles interacciones entre C y CK2, como tampoco la influencia que podría tener en el efecto final la fosforilación de R por C inherente al protocolo de medición de la reasociación de las subunidades. El uso de subunidad R purificada después de haber sido desfosforilada y completamente fosforilada por CK2 permitirá confirmar y tal vez ampliar los resultados obtenidos. Estudios adicionales enfocados a la fosforilación de la holoenzima por CK2 nos permitirán dilucidar el efecto de la fosforilación de R por CK2 sobre la disociación de la holoenzima.

En base a los interesantes resultados obtenidos en cuanto a un posible rol modulador de la fosforilación sobre la actividad de PKA nos pareció relevante investigar la fosforilación *in vivo* de la subunidad R durante la morfogénesis. Se observó que la subunidad R se encuentra fosforilada *in vivo* y que dicha fosforilación aumenta a lo largo del proceso de diferenciación. Este resultado puede deberse a un aumento de la cantidad de R como se evidenció por Western blot o a un aumento del número de sitios fosforilados por subunidad R. Para discernir entre estas alternativas es necesario llevar a cabo experimentos adicionales analizando más profundamente el tipo de fosforilación de la subunidad R a distintos tiempos de la germinación. A pesar de que los experimentos de fosforilación *in vitro* por CK2 mostraron que la subunidad R es fosforilada en Ser y en Thr *in vivo* sólo pudo detectarse fosforilación en Ser.

Por último se realizó la caracterización de los sitios fosforilados *in vivo* a través del mapeo peptídico con BrCN. Los resultados de estos experimentos fuertemente indicaron que la subunidad R es fosforilada *in vivo* por C y CK2; sin embargo no pueden descartarse fosforilaciones por otras quinasas. La fosforilación por CK2 será confirmada por secuenciación de los péptidos marcados obtenidos a partir del clivaje químico de la subunidad R fosforilada *in vivo*.

La posible regulación de la actividad de la PKA por CK2 representa un potencial mecanismo por el cual estas quinasas interactuarían para modular el crecimiento y la diferenciación en *C. albicans*.

INTEGRACION GENERAL

A continuación se resumen algunos resultados salientes de este trabajo que serán utilizados en conjunto con los conocimientos previos y estudios realizados en paralelo en nuestro laboratorio como base para la realización de un modelo tentativo de los mecanismos involucrados en la germinación inducida por NAcGlc en *C. albicans*.

Trabajos previos de nuestro laboratorio ya habían demostrado que los niveles de AMPc y la actividad de sus enzimas relacionadas son moduladas durante la morfogénesis de *C. albicans*.

En la primera parte de este trabajo se demostró claramente que el glucagon estimula la transición levadura-micelio y se propuso que el mecanismo por el cual la hormona estaría actuando involucra la vía de transducción de señales del AMPc. El marcado efecto estimulador del glucagon en la germinación inducida por suero sugiere que *in vivo*, niveles de glucagon ligeramente superiores a los normales podrían tener una gran influencia en la infección por *C. albicans* promoviendo la aparición de la forma miceliana relacionada particularmente con la invasión a tejidos. Por otro parte se aportaron nuevas evidencias que confirman la implicancia de la vía del AMPc en la morfogénesis, reforzando la idea que dicha vía podría ser disparada por hormonas del huésped interactuando con posibles receptores en la superficie celular del hongo (Zelada y col., 1996).

En vista de la relevancia del AMPc en el proceso de diferenciación de *C. albicans* iniciamos la caracterización de la PKA, principal receptor del AMPc en la célula. Fundamentalmente determinamos que *C. albicans* posee un único tipo de PKA similar al tipo II de mamíferos no observándose diferencias cualitativas en la enzima presente en distintas morfologías. Como características salientes de esta PKA podemos nombrar el inusual peso molecular de su subunidad catalítica y su marcada estimulación por policationes sin mediar disociación de la holoenzima (Zelada y col., 1997).

El rol crucial de la PKA en el proceso de morfogénesis quedó demostrado a partir del trabajo llevado a cabo en paralelo por Rocío Castilla becaria de nuestro laboratorio. En dicho trabajo se investigó el efecto *in vivo* de dos inhibidores permeables específicos de la PKA sobre la estimulación de la germinación inducida por NAcGlc. Se

comprobó que el derivado miristoilado del PKI 14-24 así como el H-89 (inhibidor competitivo del sitio de unión a ATP) bloquearon completamente la germinación inducida por NAcGlc pero no la inducida por suero. Los resultados de este trabajo demostraron que la actividad de PKA es indispensable en una etapa temprana del proceso de morfogénesis (Castilla y col., 1997).

Finalmente se estudió la fosforilación *in vivo* de la PKA como paso inicial de la investigación del posible rol regulador de la fosforilación sobre la actividad de PKA durante la morfogénesis. Se demostró que la subunidad R es fosforilada *in vivo* por C y CK2 y se planteó un posible efecto modulador de la CK2 sobre la actividad de PKA.



PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos se abren nuevas posibilidades para el estudio de la regulación de la PKA durante la morfogénesis de *C. albicans*. Algunos de los puntos más interesantes e inmediatos para investigar podrían ser:

- Estudio de la expresión de las subunidades de la PKA durante la morfogénesis. El conocimiento de las propiedades de la enzima logradas en este trabajo y el contar con los anticuerpos anti R aquí descritos serán de suma utilidad en la concreción de este estudio.
- Estudio profundo de la modulación de la actividad de la PKA durante la transición dimórfica. Experimentos preliminares indican una estimulación de la PKA a tiempos tempranos de la inducción seguida por una desaparición total de actividad a los 20 min la cual es recuperada lentamente a lo largo de la germinación. El primer abordaje en este punto será la investigación de la probable regulación de la actividad de la PKA por proteólisis de su subunidad catalítica basándonos en la extrema sensibilidad de C a la proteólisis y en los antecedentes de regulación de la actividad de PKA por este mecanismo.
- Investigación de la probable implicancia de la fosforilación de la subunidad R como moduladora de la actividad de PKA en el proceso de morfogénesis. Para ello será necesario realizar experimentos de caracterización del patrón temporal de fosforilación de R durante la diferenciación, particularmente determinando si existe alguna correlación entre la fosforilación de R por CK2 y el proceso morfogénico. La puesta a punto de la fosforilación *in vivo* y del mapeo por clivaje químico logradas en el presente trabajo será de suma utilidad en este punto.
- Búsqueda de posibles sustratos endógenos de la PKA relacionados al proceso de morfogénesis.

- Por último resulta interesante profundizar en el estudio de la regulación de la PKA por dominios básicos de sus sustratos y por fosforilación. Para este estudio contaremos en un futuro cercano con las subunidades R y C expresadas en el laboratorio del Dr. Giasson, que nos permitirán llevar a cabo experimentos cinéticos con las especies puras.

BIBLIOGRAFIA

- Alhanaty, E., Patinkin, J., Tauber-Finkelstein y Shaltiel, S. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3492-3495.
- Anderson, M. y Odds, F. (1985) *Mycosen* 28, 531-540.
- Anjard, C., Etchebehere, L., Pinaud, S., Veron, M., y Reymond, C. D. (1993) *Biochemistry* 32, 9532-9538.
- Beavo, J. A., Bechtel, P. J., Krebs, E. G. (1974) *Methods Enzymol.* 38, 299-308.
- Beebe, J. S. y Corbin, J. D. (1986) *The Enzymes* 17, 43-111.
- Beebe, J. S., Øyen, O., Sandberg, M., Frøysa, A., Hansson, V. y Johansen, T. (1990) *Mol. Endocrinol.* 4, 465-475.
- Beuhausen, S., Lee, E., Walker, B. y Bayley, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1641-1645.
- Bodenbach, L., Fauss, J., Robitzki, A., Krehan, A., Lorenz, P., Lozeman, F. y Pieyrin, W. (1994) *Eur. J. Biochem.* 220, 263-273.
- Bossemeyer, D., Engh, R. A., Kinzel, V., Ponstingl, H. y Huber, R. (1993) *EMBO J.* 12, 849-859.
- Bramley, T. A., Menzies, G. S., Williams, R. J., Adams, D. J., and Kinsman, O. S. (1990) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 167, 1050-1056.
- Braun, R., Vulliet, Carbonaro-Hall, D. y Hall, F. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 187-191.
- Brochetto-Braga, M. R., Lopes Gomes, S., y Maia J. C. C. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 295-304.
- Bubis, J., Vedvick, T. S. y Taylor, S. S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 14961-14966.
- Carmichael, d., Geahlen, R., Allen, S. y Krebs, E. (1982) *J. Biol. Chem* 257, 10440-10445.
- Carr, S. A., Biemann, K., Shoji, S., Parmelee, D. C. y Titani, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 6128-6131.

- Caticha, O. , Li, Y., Griffin, J., winge, D. y Odell, W. (1993) *Endocrinology* 132, 667-669.
- Caticha, O., Grover, S., Winge, D., and Odell, W. D. (1992) *Endocr. Res.* 18, 133-143.
- Castilla, R.; Passeron, S. y Cantore M.L. (1997) *Cellular Signalling*, en prensa.
- Clegg, C. H., Ran, W., Uhler, M. D. y McKnight, G. S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 20140-20146.
- Collett M. y Erickson, R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2021-2024.
- Chattamay, R. W., Wheeler, D. R., O' Reilly, J. (1981) *J. Gen. Microbiol.* 123, 233-240.
- Cheng, H. C., Van Patten, S.M., Smith, A. J. y Walsh, D. A. (1985) *Biochem. J.* 231, 655-661.
- Cho-Chung, Y. S. *Int. J. Oncol.* (1993) 3, 141-148.
- De Gunzburg, J, y Veron, M. (1982) *EMBO J.* 1, 1063-1068.
- De Gunzburg, J., Part, D., Guiso, N. y Veron, M. (1984) *Biochemistry* 23, 3805-3812.
- Dei-Cas, E. y Vernes A. (1986) *Critical Reviews in Microbiology* Ed. O' Leary, W. vol. 13 pp 173, CRC Press, Florida.
- Dixon, M. y Webb, E. C. (1962), *Enzymes*, 2nd edn, Academic Press, NY.
- Døskeland, S. O., Maronde, E. y Gjertsen, B. T. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1178, 249-258.
- Dunbar, B. S. (1987) *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*, Plenum Press, New York.
- Egidy, G., Páveto, C., Passeron, S., y Galvagno, M. A. (1990) *Cell. Biol. Int. Rep.* 14, 59-68.
- Egidy, G., Paveto, M. C., Passeron, S. y Galvagno, M. A. (1989) *Exp. Mycol.* 13, 428-432.
- Erlichman, J., Rosenfeld, R. y Rosen O. M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3375-3380.
- Evans, E., Odds, F., Richardson, M. y Holland, K. (1975) *Can. J. Microbiol.* 21, 338-342.

- Fantozzi, D. A., Harootunian, A. T., Wen, W., Taylor, S. S., Feramisco, J. R., Tsien, R. Y. y Meinkoth, J. L. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2676-2686.
- Fantozzi, D. A., Taylor, S. S., Howard, P. W., Maurer, R. A., Feramisco, J. R. y Meinkoth, J. L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 16824-16828.
- Franklyn K. M. y Warmington, J. R. (1994) *FEMS Microbiol.* 118, 219-226.
- Fisher, E. y Krebs, E. (1955) *J. Biol. Chem.* 216, 121-135.
- Flotow, H. y Wheldrake, J. F. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 78, 141-144.
- Gatica, M., Allende, C. C., Antonelli, M. y Allende, J. E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 324-328.
- Gatica, M., Jacob, G. y Allende, C. (1995) *Biochemistry* 34, 122-127.
- Gill, G. N. y Garren, L. D. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 786-789.
- Genrich, J. E.; Lorenzi, M.; Bier, D. M.; Schneider, V.; Tsalikian, E.; Karam, J. H. y Forsham, P. H. (1975) *N. Engl. J. Med.* 292, 985-989.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, O. P., Styles, C. A. y Fink, G. R. (1992) *Cell* 68, 1067-1090.
- Glover, C., Bidwai y Reed, J. (1994) *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 481-488.
- Gold, S., Duncan, G., Barret, K. y Kronstad, J. (1994) *Genes & Dev.* 8, 2815-2816.
- Gow N. y Gooday, G. (1984) *Sabouradia* 22, 137-140.
- Gow, N., Robbins, P. W., Lester, J. W., Brown, A.J.P., Fonzi, W. A., Chapman, T y Kinsman, O. S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6216-6220.
- Gross, R. E., Baghi, S., Lu, X. y Rubin, C. S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 6896-6907.
- Guthman, M., Pastori, R. y Moreno, S. (1990) *Cell. Signalling* 2, 395-402.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R., Montminy, R. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 4852-4859.
- Haley, B. E. (1975) *Biochemistry* 14, 3852-3857.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. y Hunter, T. (1988) *Science* 241, 42-52.

- Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hemmings, B., Aitken, A., Cohen, P., Rymond, M. y Hofmann F. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 473-481.
- Herberg, F. W. y Taylor, S. S. (1993) *Biochemistry* 32, 14105-14022.
- Hixson, C y krebs, E. G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2137-2145.
- Hu, E. y Rubin, C. (1991) *J Biol. Chem.* 266, 19796-19802.
- Hubbard, M. J., Sullivan, P. y Shepherd, M. (1985) *Can. J. Microbiol.* 31, 679-701.
- Hubbard, M. J. y Cohen, P. (1993) *Trends Biochem. Sci.* 18, 172-177.
- Kalo-Klein, A. y Witkin, S. (1990) *Infect. Immun.* 58, 260-262.
- Kemp, B. E., Graves, D. J., Benjamini, E. y Krebs, E. G. (1977) *J Biol. Chem.* 252, 4888-4894.
- Keryer G., Zhijun, L., Cavadore, J. C., erlichman, J. y Bornens, M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5418-54
- Kimura, L. y Pearsall, N. (1978) *Infect. Immun.*, 21, 64-68.
- Kinsman, O. S., Pitblado, K., y Coulson, C. J. (1988) *Mycoses* 31, 617-626.
- Kinzel, V., Hotz, A., König, N., Gagelmann, M., Pyerin, W., Reed, J., Kübler, D., Hofmann, F., Opst, C., Gensheimer, H. P., Goldblatt, D. y Shaltiel, S. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 341-349.
- Kirsh, D. R. y Whitney, R. R. (1991) *Infect. Immun.* 59, 3297-3300.
- Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Ashford, N. H., Xuong, N. H., Taylor, S. S. y Sowadski, J. M. (1991) *Science* 253, 407-414.(a)
- Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Xuong, N. H., Taylor, S. S. y Sowadski, J. M. (1991) *Science* 253, 414-420.(b)
- Kuret, J., Johnson, K. E., Nicolette, C., Zoller, M. J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 9149-9154.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.

- Land, G., Mc Donald, W., Stjernholm, R. y Friedman, L. (1976) *Infect. Immun.* 12, 119-127.
- Laurent, T. C., y Killander, J. (1964) *J. Chromat.* 14, 317-330.
- Leberer, E., Marcus D., Broadbent, I., Clark, K., Dignard, D., Zielgelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N., Brown, A. y Thomas, D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 93, 13217-13222.
- Lincoln, T. M. y Corbin, J. D. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 3239-3241.
- Liu, H., Styles, G. y Fink, G. R. (1993) *Science* 262, 1741-1743.
- Liu, H., Kohler, J. y Fink, G. R. (1994) *Science* 266, 1723-1725.
- Loose, D., Schurman, D. y Feldman, D. (1981) *Nature* 293, 477-479.
- Marques M., Juliani, M. H., Maia, J.C.C. y Gomes, S. L.(1989). *Eur. J. Biochem.* 178, 803-810.
- Marques, M. V., Cantisani-Borges, A. C., De Oliveira, J. C. E., y Lopes Gomes, S. (1992) *Dev. Biol.* 149, 432-439(a).
- Marques, M. V. y Gomes, S. L. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17201-17207 (b).
- Martin, R. G. y Ames, B. N. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- Mattia, E. y Cassone, A. (1979) *J. Gen Microbiol.* 113, 439-442.
- Mattia, E, Carruba, G., Angiollela, L. y Cassone, A. (1982) *J. Bacteriol.* 152, 552-562.
- McKnight, G. S., Clegg, C. H., Uhler, M. D., Chrivia, J. C., Cadd, G. G., Correll, L. A. y Otten, D. (1988) *Recent Prog. Horm. Res.* 44, 307-331.
- Medoff, J., Jacobson, E. y Medoff, G. (1981) *J. Bacteriol.* 145, 1425-1455.
- Mitchell, L. H. y Soll, D. R. (1979) *Exp. Cell Res.* 120, 167-179.
- Miyamoto, E., Petzold, G. L., Harris, J. S. y Greengard, P. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 305-312.
- Miyamoto, E., Petzold, G. L., Kuo, J. F. y Greengard, P. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 179-189.
- Moreno, S. y Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 321-330.

- Mosch, H., Roberts, R. y Fink, G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 5352-5356.
- Mutzel, R., Lacombe, M.-L., Simon, M.-N., de Gunzburg, J., y Véron, M. (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84, 6-10.
- Niimi, M., Niimi, K., Tokunaga, J., y Nakayama, H. (1980) *J. Bacteriol.* 142, 1010-1014.
- Odds, F. C. (1979) "Candida and candidosis" University Park Press, Baltimore.
- Odds, F. C. (1988). "Candida and candidosis", 2da Edición Bailliere Tindall, London.
- Odds, F. C. (1994). *Am. Soc. Microbiol. News*: 60, 313-318.
- Orlowski, M. (1991) *Microbiol. Rev.* 55, 234-258.
- Padmanabha, R., Chen-Wu, J., Hanna, D. y Glover, C. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 4089-4099.
- Pastori, R., Moreno, S. y Passeron, S. (1985) *Mol. Cell. Biochem.* 69, 55-66.
- Paveto, M. C., Egidy, G., Galvagno, M. A. y Passeron, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167, 1177-1183.
- Paveto, M. C., Mallo, G., Egidy, G., Galvagno, M. A. y Passeron, S. (1991) *Cell Biol. Int. Rep.* 15, 169-178.
- Paveto, M. C., Montero, L. y Passeron, S. (1992) *FEBS* 311, 51-54.
- Pieyrin, W., Voss, H., Pepperkok, R., Jakobi, R., Wirkner, U. y Lorenz, en Recent (1994) *Advances in Cellular and Molecular Biology vol 4*, 87-100. Peeters Press leuven, Belgium.
- Pilkis, S. J., Raafat el- Maghrabi, M. y Claus, T. H. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57, 755-783.
- Pinna, L. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1054, 267-284.
- Pinna, L. (1994) *Cell. Mol. Biol.* 40, 383-390.
- Pollack, J. K. y Hashimoto, T. (1987) *J. Gen Microbiol.* 133, 415-424.
- Post, S. R., Rubinstein, P. G. y Tager, H. S. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1662-1666.

- Powell y Drutz (1983) *J. Infect. Dis.* 147, 339-341.
- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O. M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3375-3380.
- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O. M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7140-7145.
- Rannels, S. R. y Corbin, J. D. (1983) en *Methods in Enzymology* (Corbin, J. D. y Hardman, J. G., Eds.) Vol. 99, 168-175. Academic Press, San Diego.
- Rannels, S., y Corbin, J. D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7085-7088.
- Reed, J. y Kinzel, V. (1984) *Biochemistry* 23, 968-973.(a)
- Reed, J. y Kinzel, V. (1984) *Biochemistry* 23, 1357-1362.(b)
- Reed, J., Kinzel, V., Kemp, B. E., Cheng, H. C. y Walsh, D. A. (1985) *Biochemistry* 24, 2967-2973.
- Reed, J., Kinzel, V., Cheng, H. C., y Walsh, D. A. (1987) *Biochemistry* 26, 7641-7647.
- Reed, J., De Ropp, J., Trewhella, J., Glass, D. B., Liddle, W. K., Bradbury, E. M., Kinzel, V. y Walsh, D. (1989) *Biochem. J.* 264, 371-380.
- Reimann, E. M., Walsh, D. y Krebs, E. G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1986-1989.
- Reimann, E. M., y Beham, R. A. (1983) *Methods in Enzymology* (Corbin, J. D., y Hardman, J. G., eds.), 99, pp. 51-55, Academic Press, San Diego.
- Rossi, S., Guthmann M. y Moreno S. (1992) *Cellular Signalling* 4, 443-451.
- Rubin, C. S., Erlichman, J., Rosen, O. M. (1974) *Methods Enzymol.* 38, 308-315.
- Rubin, C. S. y Rosen, O. M. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* 44, 831-837.
- Sabie, F. T. y Gadd, G. M. (1992) *Mycopathologia* 119, 147-156.
- Saxena, A., Padmanabha, R. y Glover, C. *Moll. Cell. Biol.* (1987) 7, 3409-3417.
- Scott, J. D. (1991) *Pharmacol. Ther.* 50, 123-145.
- Scott, J. D., Fischer, E. H., Takio, K., Demaille, J. G. y Krebs, E. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 5732-5736.(a)

- Scott, J. D., Fischer, E. H., Demaille, J. G. y Krebs, E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4379-4383.(b)
- Shepherd, M.G., Poulter, R.T.M. y Sullivan, P.A. (1985) *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 579-614.
- Shoji, S., Parmelee, D.C., Wade, R. D., Kumar, S., Ericsson, L. H., Walsh, K. A., Neurath, H., Long, G. L., Demaille, J. G., Fischer, E. H. y Titani, K. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci* 78, 848-851.
- Shoji, S., Titani, K., Demaille, J. G. y Fischer, E. H. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6211-6214.
- Showers, M. O., Maurer, R. A. (1986) *J. Biol. chem* 261, 16288-16291.
- Siegel, L. M. y Monty, K. J. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* 112, 346-362.
- Silberstein, S, Cantore, M y Passeron, S. (1990) *Arch. Biochem. Biophys* 282, 132-134.
- Steinberg, R. A., Cauthron, R. D., Symcox, M. M. y Shuntoh, H. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 2332-2341.
- Simonetti, N., Strippoli, V. y Cassone, A. (1974) *Nature*, 250, 344-346.
- Smith, C. (1985) "Candidosis" Raven Press, New York, pp 53-70.
- Soll, D., y Bedell, G. (1978) *J. Gen. Microbiol.* 108, 173-180
- Srivastava A. K. y Stellwagen, R. H (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1752-1755.
- Stewart, P. y Rogers, P. (1978) "The filamentous Fungi" vol. 3 chap. 9 Smith y Berry Eds. pp 465.
- Swarson, R., Alex, L. y Simon, M. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 485-490.
- Sy, J., y Roselle, M. (1981) *FEBS Lett.* 135, 93-96.
- Takio, K., Smith, s. B., Krebs, E. G., Walsh, K. A. y Titani, K. (1984) *Biochemistry* 23, 4200-4206.
- Tao, M. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 56-61.
- Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F. y Sowadski, J. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 84-89.

- Taylor, S. S., Bubis, J., Toner-Webb, J., Sarawast, L. D., First, E. A., Buechler, J. A., Knighton, D. R. y Sowadski, J. (1988) *Faseb J* 2, 2677-2685.
- Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L. H., Kumar, S., Smith, S. B. y Krebs, E. G. (1984) *Biochemistry* 23, 4193-4199.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., y Hurwitz, M. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 1371-1377.
- Tomis, D. C., Floyd-Smith, G. y Samuel, C. E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 10723-10728.
- Trevillyan, J. y Pall, M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3978-3986.
- Uhler, M. D. y McKnight, G. S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15202-15207.
- Uhler, M. D., Carmichael, D. F., lee, D. C., Chrivia, J. C., Krebs, E. G., McKnight, G. S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1300-1304. (b)
- Uhler, M. D., Chrivia, J. C., y McKnight, G. S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 15360-15363. (a).
- Unger, R. H. (1976). Diabetes and the alpha cell. *Diabetes* 25, 136-151.
- Unger, R. H. y Orci, L. (1975) *Lancet* 1, 14-16.
- Unson, C. G.; Andreu, D., Gurzenda, E. M. y Merrifield, R. B. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 4083-4087.
- Unson, C. G.; Gurzenda, E. M. y Merrifield, R. B. (1989). *Peptides* 10, 1171-1177.
- Van Rij, K. N. J. W. (1984) "The yeasts a taxonomic study" 3ra. Edición Groninagen, The Netherlands, pp 1082.
- Wain, W. H., Brayton, A. R. y cawson, R. A. (1976) *Mycol. Mycopathol. Appl.* 58, 27-29.
- Walter, U., Uno, I., Liu, A.Y.C. y Greengard, P. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6494-6500.
- Walsh, D., Perkins, J. y Krebs, E. G. (1971) *J. Biol. Chem.* 243, 3763-3766.
- Wang, Y., Scott, J. D., McKnight, G. S., y Krebs, E. G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 2446-2450.

- Weber, W. y Hilz, H. (1986) *Biochemistry* 25, 5661-5667.
- Wiemann, S., Kinzel, V. y Pyerin, W. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 5140-5146.
- Williams, R. J., Dickinson, K., Kinsman, O. S., Bramley, T. A., Menzies, G. S. y Adams, D. J. (1990) *J. Gen Microbiol.* 136, 2143-2148.
- Witehouse, S. y Walsh, D. A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3682-3692.
- Yang, S., Fletcher, W. H. y Johnson, D. A. (1995) *Biochemistry* 34, 6267-6271.
- Yeaman, S. J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1052, 128-132.
- Yonemoto, W., Mc Glone, M. L. y Taylor, S. S. (1993) *J. Biol. Chem* 268, 2348-2352.
- Zaremborg, V. y Moreno, S. (1996) *Eur. J. Biochem.* 237, 136-142.
- Zelada, A., Castilla, R., Passeron, S. y Cantore M. L. (1996), *Cell. and Mol. Biol.* 42, 567-576.
- Zelada, A.; Passeron, S. y Cantore, M. L. (1997) *Eur. J. Biochem.*, en revisión.
- Zheng, J., Knighton, D. R., Ten Eyck, L. F., Karlsson, R., Xuong, N. Taylor, S. S. y Sowadski, J. M. (1993) *Biochemistry* 32, 2154-2161.